

---

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
der Philipps-Universität Marburg,  
Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie,  
Endokrinologie und Stoffwechsel  
**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress**

# **Charakterisierung des STAT3-Signalwegs in der NFATc1-abhängigen Genese und Progression des Pankreaskarzinoms**



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Marius Brunner**  
aus Fulda in Hessen  
Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität-Marburg am:  
28.6.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

**Dekan**: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

**Referent**: Herr Prof. Dr. Volker Ellenrieder

**1. Korreferent**: Herr. Prof. Dr. Andreas Burchert



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Zusammenfassung .....	VII
Summary .....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Diagnose und Therapie .....	2
1.2 Molekularbiologische und histologische Grundlagen des Pankreaskarzinoms.....	3
1.3 Entzündung und Karzinom .....	4
1.4 Der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT).....	5
1.5 Die Rolle von NFAT im Pankreaskarzinom .....	6
1.6 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3).....	8
1.6.1 Der JAK-STAT3 Signalweg .....	9
1.6.2 Die Rolle von STAT3 in Neoplasien.....	10
1.6.3 Die Rolle von STAT3 im Pankreaskarzinom .....	11
1.7 NFATc1 und STAT3 im Pankreaskarzinom .....	11
1.8 Die Interaktion von NFATc1 und STAT3 am Genom .....	13
1.9 Enhancer und Promotorregionen .....	14
2 Zielsetzung der Arbeit.....	17
3 Material.....	18
3.1 Laborgeräte.....	18
3.2 Materialien .....	21
3.3 Chemikalien .....	22
3.4 Standards, Kultivierungsmedien und Zusätze .....	25
3.5 Kits.....	25
3.6 Vektoren und Konstrukte.....	26
3.7 Enzyme.....	27
3.8 Oligonukleotide .....	28
3.9 Puffer .....	29
3.9.1 Lysepuffer für DNA-Aufbereitung.....	29
3.9.2 Zelllysepuffer .....	29
3.9.3 Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	30
3.9.4 Puffer für Western Blot .....	31
3.9.5 Puffer zum Entwickeln und Waschen der Nitrocellulosemembran.....	31
3.9.6 Puffer für Agarose-Gel-Elektrophorese.....	32
3.9.7 Puffer für Chromatinimmunopräzipitation.....	33
3.9.8 Puffer für Immunhistochemie .....	35
3.9.9 Sonstige Puffer .....	36

4	Methoden .....	37
4.1	Zuchtmäuse .....	37
4.1.1	Zuchtlinien .....	37
4.1.2	Opferung und Präparation der Mäuse .....	39
4.2	Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren .....	41
4.2.1	Genotypisierung der verwendeten Mäuse .....	41
4.2.2	DNA-Extraktion aus Mausgewebeproben .....	41
4.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase chain reaction) .....	41
4.2.4	Durchführung der Genotypisierungs-PCR .....	42
4.2.5	Verwendete PCR-Primer & Programme für Genotypisierungen .....	43
4.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	45
4.2.7	Agarosegelelektrophorese .....	45
4.2.8	RNA-Präparation aus Gewebeproben .....	47
4.2.9	Reverse Transkription – die cDNA-Synthese .....	47
4.2.10	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) .....	48
4.2.11	Verwendete Primer für Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) .....	49
4.3	Zellbiologische Methoden .....	51
4.3.1	Verwendete Zelllinien .....	51
4.3.2	Kryokonservierung von Zellen .....	52
4.3.3	Auftauen von Zellen .....	52
4.3.4	Zellzahlbestimmung .....	52
4.3.5	Transfektion der Zelllinien .....	53
4.3.6	Luciferase-Reportergenassay .....	53
4.3.7	DNase 1 Hypersensitivitäts-Assay .....	53
4.4	Proteinbiochemische Methoden .....	54
4.4.1	Proteinisolation aus Zelllinien .....	54
4.4.2	Isolierung von Protein aus Geweben .....	54
4.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	55
4.4.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	55
4.4.5	Western-Blot-Analyse .....	56
4.5	ChIP (Chromatinimmunopräzipitation) .....	58
4.5.1	Versuchstag 1 .....	58
4.5.2	Versuchstag 2 .....	59
4.5.3	Versuchstag 3 .....	61
4.5.4	Versuchstag 4 .....	62
4.6	Histologie .....	63
4.7	Histologische Färbungen .....	63
4.7.1	H & E Färbung .....	63
4.7.2	Stromafärbung (Kollagen 1 & 3) .....	64
4.8	Statistische Auswertung .....	64
5	Ergebnisse .....	65
5.1	NFATc1 bindet distal von Promotoren ausgewählter Zielgene und reguliert darüber deren Transkription .....	65

5.2	NFATc1-Bindungsstellen an ausgewählten Zielregionen weisen Enhancer-typische Modifikationen auf.....	66
5.3	STAT3 bindet primär an Promotoren ausgewählter Zielgene .....	71
5.4	STAT3 reguliert die NFATc1-Bindung an ausgewählten Enhancerregionen und reguliert die Genexpression gemeinsamer Zielgene .....	71
5.5	Interleukin-6 reguliert sowohl die Bindung von NFATc1 an Enhancersignaturen als auch die Bindung von STAT3 am Promotor und induziert dadurch die Transkription ausgewählter Zielgene .....	75
5.6	Der transgene Verlust von STAT3 führt nicht zur erwarteten längeren Lebensdauer von NFATc1 <sup>+/-wt</sup> , LSL-KRAS <sup>G12D</sup> , p48(Pdx1)-Cre-Mäuse .	78
5.7	Homozygote KNS-Mäuse zeigen im Vergleich zum NKC-Mäusen deutlich vergrößerte Pankreastumoren zu Referenzzeitpunkten .....	79
5.8	Homozygote KNS-Mäuse zeigen eine deutlich schnellere Karzinomentwicklung sowie einen erhöhten Stromanteil im Karzinom .	81
5.9	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	84
6	Diskussion .....	85
6.1	Die Rolle von NFATc1-Partnerproteinen in der Transkriptionskontrolle	86
6.2	NFATc1 und STAT3 bilden einen Komplex, welcher durch Enhancer-Promotor-Kommunikation die Transkription von onkogenen Faktoren im Pankreaskarzinom fördert .....	87
6.3	Homozygoter STAT3-Knockout führt zu einer signifikanten verringerten mittleren Überlebenszeit im Vergleich zu NKC-Mäusen .....	89
6.4	Die Rolle von NFAT und STAT3 in der Therapie des humanen Pankreaskarzinoms.....	92
6.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	94
7	Literaturverzeichnis.....	96
8	Anhang.....	105
8.1	Tabellenverzeichnis .....	105
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	106
8.3	Abkürzungsverzeichnis .....	109
8.4	Verzeichnis akademischer Lehrer .....	112
9	Danksagung .....	114

## Zusammenfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas zählt zu den aggressivsten soliden Tumoren und ist durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Standardchemotherapeutika sowie eine infauste Prognose gekennzeichnet. Detaillierte Untersuchungen der zugrunde liegenden Mechanismen beschreiben eine zentrale Rolle inflammatorischer Signalwege in der Karzinogenese und Progression des Pankreaskarzinoms. In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe den inflammatorischen Transkriptionsfaktor NFATc1 als wichtiges Onkogen in der Entzündungs-assoziierten Pankreaskarzinogenese identifizieren. Molekulare Analysen in diversen *in vitro* und *in vivo* Modellen des Pankreaskarzinoms ergaben darüber hinaus, dass NFATc1 in einem hohen Prozentsatz humaner Pankreaskarzinome überexprimiert wird und funktionell mit dem inflammatorischen Transkriptionsfaktor STAT3 interagiert, um onkogene Gensignaturen während der Progression des Pankreaskarzinoms zu kontrollieren.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus der NFATc1:STAT3-abhängigen Genregulation genauer zu untersuchen und die Komplexbildung beider Partner an der DNA zu charakterisieren. Weiterhin sollte die biologische Relevanz eines konditionalen STAT3-Verlusts im Kontext einer pankreasspezifischen KRAS<sup>G12D</sup>- sowie NFATc1-Aktivierung in einem transgenen Mausmodell *in vivo* analysiert werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die NFATc1-abhängige transkriptionelle Regulation onkogener Gensignaturen die Bindung des Transkriptionsfaktors an Enhancerregionen ausgewählter Zielgene voraussetzt. Im Gegensatz dazu identifizierten ChIP-Analysen das NFATc1-Partnerprotein STAT3 an den jeweiligen Promotoren NFATc1-kontrollierter Zielgene. Darüber hinaus werden sowohl die NFATc1-Bindung an dessen Zielgenen sowie deren transkriptionelle Aktivierung durch NFATc1 maßgeblich von der Aktivität des IL-6-STAT3-Signalwegs determiniert. Diese Ergebnisse suggerieren eine Enhancer-Promotor-Loop-Formation als Mechanismus der Transkriptionskontrolle onkogener Signaturen durch NFATc1:STAT3 Komplexe.

Um die biologische Relevanz dieser Interaktion *in vivo* zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das zusätzlich zu den konstitutiven Aktivierungen von KRAS<sup>G12D</sup> und NFATc1 einen Verlust der STAT3-Expression im Pankreas aufweist. Diese Mäuse zeigten entgegen der Erwartungen eine beschleunigte Pankreaskarzinomprogression und eine deutlich verringerte mittlere Überlebenszeit von nur 60 Tagen ge-

genüber ihren Wurfgeschwistern ohne pankreasspezifischen STAT3-Verlust. Morphologisch waren die Pankreaskarzinome STAT3-defizienter Mäuse durch eine ausgeprägte Zunahme des stromalen Tumoranteils gekennzeichnet.

Diese Arbeit unterstreicht die onkogenen Funktionen von NFATc1 in der Karzinogenese und Progression des Pankreaskarzinoms und identifiziert die Komplexbildung mit STAT3 als zentralen transkriptionellen Mechanismus für die Kontrolle onkogener Gensignaturen im inflammations-assoziierten Pankreaskarzinom. Trotz der Charakterisierung von NFATc1 als vielversprechende Zielstruktur in der Behandlung des Pankreaskarzinoms existieren bis dato keine therapeutischen Strategien, die eine spezifische pharmakologische Inhibition von NFATc1 in der Tumorzelle ermöglichen.

Vor dem Hintergrund erfolgsversprechender Daten einer aktuellen klinischen Studie zur Inhibition des Jak/STAT3-Signalwegs in der Therapie des Pankreaskarzinoms und der hier beschriebenen zentralen Funktion von STAT3 in der NFATc1-abhängigen Transkriptionskontrolle erscheint die pharmakologische Inhibition des NFATc1-Partnerproteins STAT3 ein vielversprechender indirekter therapeutischer Ansatz für die Blockade der NFATc1-vermittelten Tumorprogression zu sein. Die beschleunigte Tumorprogression im STAT3-defizienten *in vivo* Modell auf der Basis einer konstitutiven NFATc1-Aktivierung hingegen deutet darauf hin, dass eine Inhibition des Jak/STAT3-Signalwegs v.a. in NFATc1-negativen Pankreaskarzinomen wirksam sein könnte und unterstreicht somit die Notwendigkeit der molekularen Stratifizierung für die Therapie dieser heterogenen Tumorerkrankung.



## Summary

The ductal adenocarcinoma of the pancreas is one of the most aggressive solid tumors and known for both its resistance against common chemotherapeutics and its poor prognosis. Detailed analysis of the mechanism that leads to the development of pancreatic cancer have underlined the significance of inflammatory pathways in development and progression of this malignancy. Existing data published by our group has identified NFATc1 as an important player in the inflammation-driven carcinogenesis of the pancreas. Furthermore, molecular analyses of both *in vivo* and *in vitro* models have shown that NFATc1 is expressed in the majority of human pancreatic adenocarcinomas and interacts with the inflammatory transcription factor STAT3. Together, they control the expression of oncogenes during the progression of pancreatic cancer.

As a consequence, the aims of this thesis were not only to examine the detailed mechanisms of NFATc1:STAT3 dependent gene regulation, but also to scrutinize the biological relevance of this oncogenic complex in a transgenic mouse model with a conditional loss of STAT3 in the context of KRAS<sup>G12D</sup> and NFATc1 activation in the pancreas.

The data published in this thesis show that the NFATc1 dependent transcriptional regulation of oncogenic signatures is the consequence of an enhancer augmented binding of NFATc1. In contrast to that, ChIP-analysis identified that the NFATc1 binding partner STAT3 preferably binds to promoter regions of NFATc1 controlled target genes. Furthermore, both the NFATc1 binding to the target genes and their transcriptional activation are strongly regulated by the Interleukin-6-STAT3-pathway. These results propose enhancer-promotor-loop-formation as a likely mechanism of NFATc1:STAT3 dependent transcriptional control of oncogene expression in pancreatic cancer.

To underline the biological significance of these findings *in vivo*, we created a transgenic mouse model with constitutive activations of KRAS and NFATc1 and a loss of pancreatic STAT3 expression. Surprisingly, these mice showed a more rapid pancreatic cancer progression and a median survival time of only 60 days compared to their littermates without a pancreatic loss of STAT3.

Morphologically, the tumors of the STAT3 deprivant mice were hallmarked with a significant increase in the proportion of tumor stroma.

The results presented here underline the oncogenic function of NFATc1 in pancreatic cancer development and progression and identified complex formation with STAT3 as a central transcriptional mechanism in the control of oncogenic gene signatures in inflammation-induced pancreatic cancer. Despite of the identification of NFATc1 as a promis-

ing target in pancreatic cancer therapy, therapeutic strategies to pharmacologically inhibit NFATc1 activity in pancreatic cancer cells are missing. In the context of promising clinical trials dealing with the inhibition of the JAK/STAT3 pathway in the therapy of pancreatic cancer and the herein described central role of STAT3 in NFATc1 dependent transcription, the pharmacological inhibition of the NFATc1 binding partner STAT3 seems to be a promising indirect therapeutic target to block NFATc1 mediated pancreatic cancer progression. Contrarily, the accelerated tumor progression in the STAT3-deficient mouse model in the setting of a constitutive NFATc1 activation suggests that the inhibition of the JAK/STAT3 pathway is only efficient in NFATc1-negative pancreatic cancers. These finding underline the necessity of a molecular therapeutic stratification of pancreatic cancer patients.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

In Deutschland erkranken jährlich etwa 16.000 Menschen an einem dukalen Adenokarzinom des Pankreas (im Folgenden als Pankreaskarzinom bezeichnet), was einer Inzidenz von 9-14 pro 100.000 Einwohnern entspricht (Krebsdaten 2015). Das Pankreaskarzinom betrifft in der Regel häufiger Männer und tritt vermehrt in Industrienationen auf; das mediane Alter bei Diagnosestellung ist 71 Jahre (Ryan et al. 2014). In den USA ist das Pankreaskarzinom 2011 sowohl bei Frauen als auch bei Männern die vierthäufigste krebssassoziierte Todesursache gewesen (Siegel et al. 2015). Wegen der ungünstigen Prognose und häufig späten Diagnosestellung entspricht die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr nahezu jener der Todesfälle. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag 2010 bei nur 7 Prozent, was den niedrigsten Wert aller malignen Neoplasien in den USA darstellt (Siegel et al. 2015). Das durchschnittliche Risiko, jemals im Leben am Pankreaskarzinom zu erkranken, beträgt in Deutschland geschlechterunspezifisch 1.6 % (Krebsdaten 2015). Aktuelle Studien gehen davon aus, dass das Pankreaskarzinom 2020 die zweittödlichste maligne Neoplasie in den USA sein wird (Garrido-Laguna & Hidalgo 2015).

Heute gilt als gesichert, dass Tabakexposition eine kausale Rolle in der Entstehung des Pankreaskarzinoms darstellt und für 20-35% aller Pankreaskarzinom-Neuerkrankungen verantwortlich ist, wobei das Risiko von Häufigkeit und Expositionsdauer abhängt (Hassan et al. 2007). Weiterhin gilt es als gesichert, dass neben fortgeschrittenem Lebensalter und vererbbaaren Faktoren auch Adipositas, Diabetes, hoher Alkoholkonsum (>60 g/d) und chronische Pankreatitiden eine Rolle bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielen. Darüber hinaus steigt das relative Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, deutlich an, wenn ein Verwandter 1. Grades bereits daran erkrankt war (Yeo 2015; Jacobs et al. 2010; Klein et al. 2004; Hassan et al. 2007).

### 1.1.2 Diagnose und Therapie

Da das Pankreaskarzinom auch aufgrund der retroperitonealen Lage in frühen Stadien keine oder nur sehr unspezifische körperliche Symptome verursacht, erfolgt die Diagnosestellung häufig erst in einem fortgeschrittenen und damit nicht mehr resektablen Zustand (Yeo 2015). Die Symptome, die zur Diagnose eines Pankreaskarzinoms führen, sind abhängig von der Lokalisation des Tumors innerhalb des Pankreas (DiMagno 1999). Häufig zeigen sich unspezifische Symptome wie Kraftlosigkeit, Gewichtsverlust, Bauchschmerzen und Fieber (Porta et al. 2005). Ein schmerzloser Ikterus ist ein häufiges Symptom von Tumoren, die im Bereich des Pankreaskopfes sitzen (Porta et al. 2005).

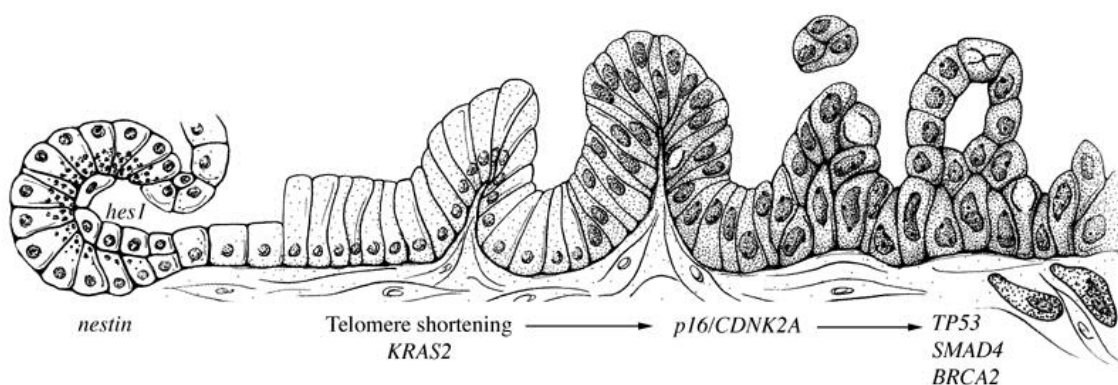
Die einzige kurative Therapie ist die radikale Resektion des Tumors (Garrido-Laguna & Hidalgo 2015). Bereits über 50% der Pankreaskarzinome weisen allerdings bei Diagnosestellung Fernmetastasen auf und sind dadurch nicht mehr resektabel (Siegel et al. 2015). Nach umfangreichen Staginguntersuchungen durch Bildgebungen wie CT, MRT und/oder Endosonographie kommen schlussendlich nur 15-20% der Patienten für eine operative Resektion mit adjuvanter Chemotherapie in Frage (Konstantinidis et al. 2013; Ryan et al. 2014). Bei bereits vorhandenen Fernmetastasen oder Infiltraten in die Nachbarregionen ist eine Operation in der Regel nicht mehr möglich und es bleibt nur noch der palliative Ansatz aus Chemo- und evtl. Strahlentherapie (Neesse et al. 2014).

Die späte Diagnosestellung gepaart mit der aggressiven Tumorbilogie sowie frühen Metastasierungstendenz des Pankreaskarzinoms erschweren eine adäquate Therapie und verschlechtern die Prognose deutlich (Ryan et al. 2014; Ghaneh et al. 2008). Aufgrund der häufigen Irresektabilität des Befundes haben neoadjuvante und palliative Chemotherapien einen großen Stellenwert in der aktuellen Forschung eingenommen. Nachdem seit 1997 Gemcitabine die Standardtherapie für das metastasierte Pankreaskarzinom gewesen war, konnte in den letzten Jahren für FOLFIRINOX (Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin) sowie Gemcitabine-nab-Paclitaxel ein signifikanter lebensverlängernder Effekt nachgewiesen werden (Conroy et al. 2011; Von Hoff et al. 2013). Trotzdem bleibt die Prognose mit einer mittleren Überlebenszeit von 11.1 Monaten bei FOLFIRINOX-Therapie oder 8.5 Monaten bei Gemcitabine-nab-Paclitaxel-Therapie weiterhin sehr schlecht (Conroy et al. 2011; Von Hoff et al. 2013). Die Rolle von neoadjuvanter Chemotherapie wird aktuell beispielsweise noch im Rahmen der NEO-PAC-Studie untersucht (Heinrich et al. 2011).

Aktuell gibt es das Pankreaskarzinom betreffend noch keine effektiven Screeninguntersuchungen, um diesen malignen Prozess frühzeitig genug zu detektieren (Becker 2014). Im Gegensatz zu anderen Karzinomtypen hat sich auch gezeigt, dass eine Chemoprävention mit ASS nicht wirksam ist (Cook et al. 2005).

## 1.2 Molekularbiologische und histologische Grundlagen des Pankreaskarzinoms

Ähnlich wie bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms geht man heute davon aus, dass auch der Entstehung des Pankreaskarzinoms ein mehrstufiges Geschehen zugrunde liegt. Die häufigsten Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms machen die *pancreatic intraepithelial neoplasias* (PanINs) aus; deutlich seltener dagegen sind die *intra-ductal pancreatic mucinous neoplasias* (IPMNs) (Koorstra et al. 2008; Hruban, Maitra, Schulick, et al. 2008). Die PanINs entwickeln sich aus den azinären Zellen des Pankreas über eine azinär-duktales Metaplasie (ADM). Die verschiedenen Stadien der PanINs bezeichnen dabei eine intraepitheliale Neoplasie mit flachen Epithelhyperplasien ohne Atypien (PanIN-1A) sowie papilläre Hyperplasien ohne Atypien (PanIN-1b) oder mit Atypien (PanIN-2). Im weiteren Transformationsprozess kann es dann entweder zur Entstehung eines Carcinomas in situ (PanIN 3), aber auch zur Entwicklung eines invasiven Pankreaskarzinoms, kommen (Abb.1) (Koorstra et al. 2008).



**Abbildung 1: Modell der genetischen und histologischen Progression im Pankreaskarzinom.** Beginnend links mit einer physiologischen azinären Pankreaszelle (links) bis zum invasiven Pankreaskarzinom (rechts) (Hruban, Maitra & Goggins 2008).

Die molekularbiologischen Grundlagen des Pankreaskarzinoms sind aktuell noch ein intensiver Gegenstand der Forschung. In über 99 Prozent der Fälle lässt sich eine aktivierende Mutation des Onkogens KRAS nachweisen (Kanda et al. 2012; Waddell et al. 2015), was dadurch die früheste und gleichzeitig auch häufigste genetische Veränderung im Rahmen der Entstehung des Pankreaskarzinoms ist (Hruban, Maitra, Schulick, et al. 2008). Die häufigste Mutation ist ein Austausch von Glycin durch Aspartat auf Codon 12, was zu einer konstitutiv aktiven Form der KRAS-GTPase führt (Collins et al. 2012). Die Relevanz dieser Mutation für die Entstehung sowie die Aufrechterhaltung des Pankreaskarzinoms wurde vielfach in genetisch modifizierten Mausmodellen durch die gezielte Aktivierung von KRAS<sup>G12D</sup> im embryonalen Pankreasgewebe gezeigt. Durch diese Aktivierung kann es zuerst zur Entstehung von PanIN-Vorläuferläsionen kommen sowie im weiteren Verlauf, durch weitere tumorfördernde genetische oder Umwelt-assoziierte Ereignisse ein invasives Pankreaskarzinom entstehen (Qiu & Su 2013).

Diese Mutation alleine ist allerdings in der Regel nicht ausreichend für die Entstehung eines invasiven Karzinoms. Vielmehr werden weitere genetische Veränderungen oder Signale aus der Tumorumgebung benötigt, um eine Tumorentstehung sowie Progression zum invasiven Karzinom zu ermöglichen. Zu diesen zusätzlichen Veränderungen gehören beispielsweise die Inaktivierungen verschiedener Tumorsuppressorgene (z.B. p16 oder p53) (Xie et al. 2006; Matsuda et al. 2015; Hezel et al. 2006).

### 1.3 Entzündung und Karzinom

Die chronische Pankreatitis, eine anhaltende Entzündung des Pankreas, wurde als ein signifikanter Risikofaktor für die Entstehung des Pankreaskarzinoms identifiziert (Jura et al. 2005; Duell et al. 2012). Aktuelle Arbeiten an genetisch veränderten Mausmodellen weisen außerdem darauf hin, dass die Induktion einer Entzündung im Pankreasgewebe zusammen mit einer KRAS<sup>G12D</sup>-Mutation zu einer beschleunigten Entstehung von PanIN-Läsionen und in der Folge auch zu einer schnelleren Entstehung eines invasiven Pankreaskarzinoms führt (Guerra et al. 2015; Baumgart et al. 2014). Für die Behandlung des invasiven Pankreaskarzinoms beim Menschen ergeben sich aus diesen Erkenntnissen zwei mögliche Ziele: Das erstere und logische Ziel, die gezielte medikamentöse Therapie des aktivierten KRAS<sup>G12D</sup>-Signalwegs, erscheint nach aktuellem Forschungsstand als nahezu unmöglich (H. Singh et al. 2015; Cox et al. 2014). Daher gilt es als

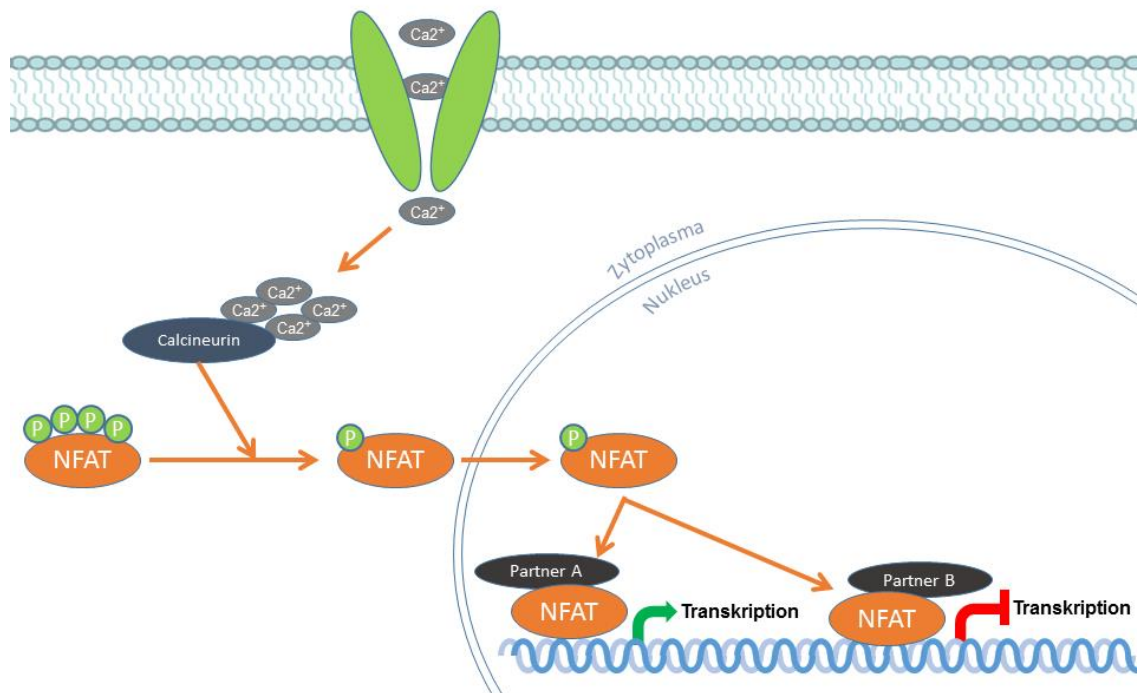
primäres Ziel der Forschung, Interaktionspartner der KRAS<sup>G12D</sup> vermittelten und Inflammations-getriggerten Karzinogenese zu finden und deren Therapierbarkeit zu untersuchen.

## 1.4 Der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT)

Da die pankreasspezifische Mutation von KRAS in der Regel nicht für die Entstehung des Pankreaskarzinoms ausreichend ist, wird neben den bekannten Mutationen wie p53 oder p16<sup>INK4</sup> nach weiteren tumorfördernden Faktoren gesucht (Becker 2014; Ghaneh et al. 2008; Hezel et al. 2006). Der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen, kurz NFAT, wurde 1988 erstmals als induzierbarer Faktor in aktivierten T-Zellen beschrieben (Shaw et al. 1988). Die verschiedenen Mitglieder der NFAT-Familie sind in nahezu jeder Zelle zu finden und erfüllen eine Reihe wichtiger regulatorischer Funktionen innerhalb verschiedenster Zelltypen, beispielsweise in der Regulation von T-Zellen oder zur weiteren Differenzierung von Herzmuskelzellen (Crabtree & Olson 2015; Hogan et al. 2003; Mancini & Toker 2009).

Die NFAT-Familie umfasst fünf Mitglieder: NFAT1 (auch als NFATc2 bekannt), NFAT2 (NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (c3) und NFAT5 (Mancini & Toker 2009). Außer NFAT5 werden alle Isoformen durch einen Calciumeinstrom in die Zelle aktiviert (Aramburu et al. 2006). Diese Calcium-sensitiven NFAT-Isoformen sind im inaktiven Zustand im Zytoplasma phosphoryliert. Durch einen Calciuminflux in die Zelle werden die NFAT-Isoformen durch Calcineurin dephosphoryliert und können so in den Zellkern translozieren. Im Nucleus können NFAT Proteine alleine oder durch Interaktion mit verschiedenen Partnern die Transkription verschiedenster Zielgene aktivieren oder hemmen (Abb. 2) (Luo et al. 1996; Mancini & Toker 2009; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010).

Aktuelle Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet schreiben NFAT eine wichtige Rolle in der Karzinogenese unterschiedlicher Tumorentitäten zu. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene NFAT-Isoformen sowohl in soliden als auch in hämatologischen Tumoren überexprimiert sind und dort verschiedene Zellfunktionen wie invasives Wachstum, Differenzierung oder auch Apoptose des Tumors beeinflussen können (Tripathi et al. 2014; Remo et al. 2015; Zhang et al. 2015; Medyouf et al. 2007; Kaunisto et al. 2015).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der NFAT-Signalkaskade.** NFAT1-4 wird durch einen Calciumeinstrom in die Zelle durch Calcineurin dephosphoryliert und kann durch diese Modifikation in den Zellkern translozieren, um anschließend transkriptionell aktiv zu werden. Modifiziert und vereinfacht (Luo et al. 1996; Mancini & Toker 2009; Buchholz & Ellenrieder 2007; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010).

## 1.5 Die Rolle von NFAT im Pankreaskarzinom

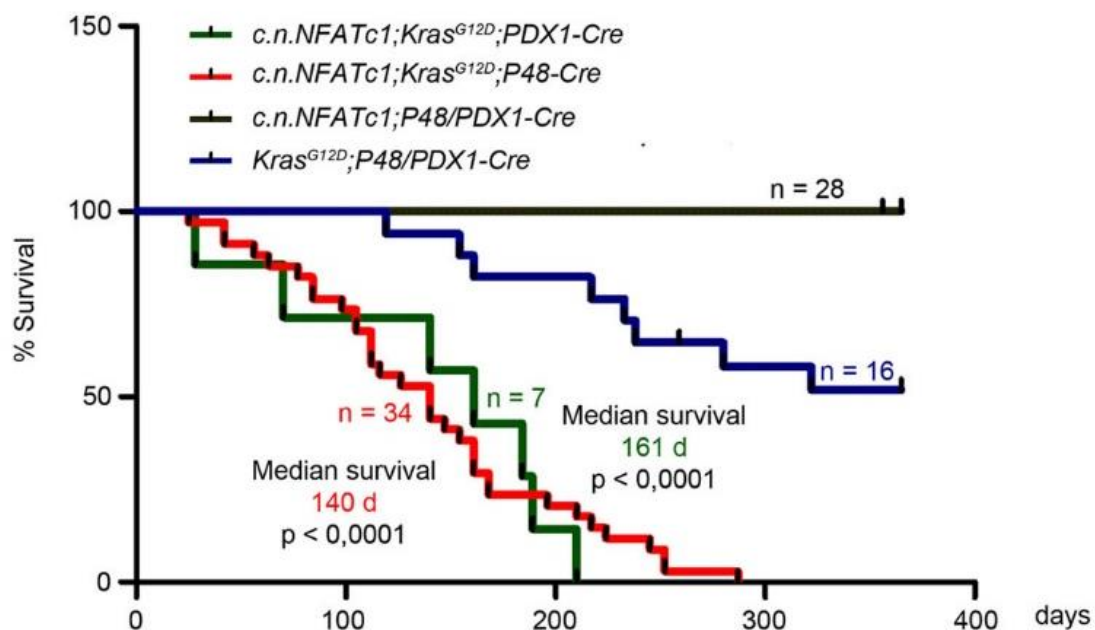
Seit der Erstbeschreibung der NFAT-Familie 1988 ist auch die Rolle der einzelnen NFAT-Isoformen in der Entstehung verschiedener Malignitäten ein Gegenstand der Forschung (Mancini & Toker 2009; Arlt et al. 2012). In unserer Arbeitsgruppe setzen wir uns seit vielen Jahren intensiv mit der Rolle von NFATc1 in der Entstehung des Pankreaskarzinoms auseinander. Obwohl NFATc1 in gesunden menschlichen und murinen Pankreaszellen nicht exprimiert wird, konnten wir in unserer Arbeitsgruppe nachweisen, dass NFATc1 in Pankreatitis-assoziierten Pankreaskarzinomen stark aktiviert vorliegt und damit eine entscheidende Rolle in der Inflammations-getriggerten Karzinogenese spielt (Baumgart et al. 2013; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010; Buchholz & Ellenrieder 2007; Buchholz et al. 2006; Chen et al. 2015). Um diese Entdeckungen im transgenen Mausmodell zu bestätigen, wurde ein Mausmodell generiert, welches gleichzeitig eine Aktivierung von NFATc1 sowie eine KRAS<sup>G12D</sup>-Mutation trägt. Diese transge-



nen Mäuse entwickelten nach 8 Wochen nicht nur deutlich vermehrt und weiter fortgeschrittene PanIN-Läsionen (Tab. 1), sondern zeigten im Vergleich zu Tieren mit alleiniger pankreasspezifischer  $KRAS^{G12D}$ -Mutation eine erhöhte Tumorinzidenz (Baumgart et al. 2014). Nach 36 Wochen hatten alle Mäuse dieses Genotyps ein invasives Pankreaskarzinom entwickelt. Folglich war die mittlere Überlebenszeit dieser Mäuse deutlich verringert im Vergleich zu den Artgenossen, die eine alleinige  $KRAS^{G12D}$ -Mutation trugen (Abb. 3) (Baumgart et al. 2014).

	$KRAS^{G12D}$	$KRAS^{G12D}; NFATc1^{+/wt}$
<b>PanIN 1</b>	10 %	45 %
<b>PanIN 2</b>	5 %	25 %
<b>PanIN 3</b>	0 %	15 %

Tabelle 1 - Anzahl der verschiedenen PanIN-Läsionen nach 8 Wochen im Vergleich (Baumgart et al. 2014).



**Abbildung 3: Überlebenskurve verschiedener Mausgenotypen nach Kaplan-Meier.** Darstellung des Überlebens von Pdx1/p48-Cre;  $KRAS^{G12D}$ ; NFATc1-Mäusen verglichen mit Pdx1/p48-Cre;  $KRAS^{G12D}$  und Pdx1/p48-Cre; NFATc1-Mäusen (Baumgart et al. 2014).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die alleinige Aktivierung von NFATc1 im Mausmodell ohne KRAS<sup>G12D</sup>-Mutation nicht zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms führt (Abb.3) (Baumgart et al. 2014). Folglich geht man davon aus, dass die NFATc1 vermittelte Entzündungsreaktion allein nicht zur Entstehung eines invasiven Karzinom ausreicht, aber über ein Zusammenspiel mit einer KRAS<sup>G12D</sup>-Mutation zu selbigem führen kann (Baumgart et al. 2014). Diese Erkenntnis deckt sich mit vorherigen Arbeiten, die die gleichzeitige Expression sowohl von NFATc1 als auch von KRAS<sup>G12D</sup> in der Mehrzahl der menschlichen Pankreaskarzinome beschreibt (Buchholz et al. 2006).

Um den Mechanismus der NFATc1-vermittelten Karzinogenese weiter zu untersuchen, wurden Tumorzelllinien aus den KRAS<sup>G12D</sup>; NFATc1<sup>+/-wt</sup>-Tumoren generiert. NFATc1-abhängige genomweite Expressionsanalysen in diesen Zellen identifizierten den „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“ (STAT3) als neues NFATc1-Zielgen (Baumgart et al. 2014).

## 1.6 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)

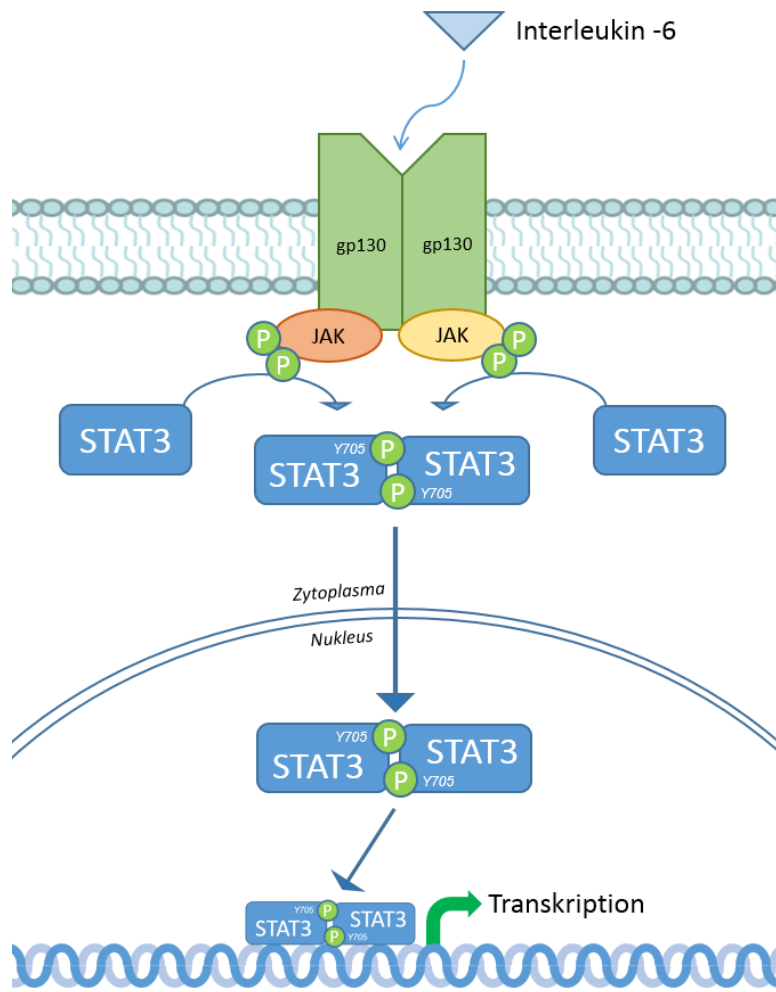
Der JAK-STAT-Signalweg (Januskinase-signal transducer and activator of transcription) wird durch eine Vielzahl verschiedener Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren aktiviert (Darnell 1997). Die verschiedenen JAK-Proteine (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) dienen der Phosphorylierung der STAT-Proteine, was zur Dimerisierung derselben und damit zu deren Aktivierung und Translokation in den Zellkern führt. Zur STAT-Familie gehören nach heutigem Kenntnisstand die Proteine STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6 (O'Shea et al. 2013).

Während STAT2, STAT4 und STAT6 besonders in der Immunregulation eine wichtige Rolle spielen und vor allem für die Entwicklung von T-Zellen verantwortlich sind, hat sich in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass STAT5A, STAT5B und besonders STAT3 eine essentielle Rolle in der Entstehung verschiedener Neoplasien spielen, da sie wichtige Zelleigenschaften wie Zellzyklusregulation und Apoptose steuern und beeinflussen können (Migone et al. 1995; Darnell 1997; Koskela et al. 2012; Siveen et al. 2014). In der Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen verschiedener Neoplasien hat STAT3 von allen Mitgliedern der STAT-Familie die größte Aufmerksamkeit bekommen.

Der Signal Transducer and Activator of Transcription 3, kurz STAT3, wurde erstmals als von Interleukin-6 induzierbarer sowie DNA-bindender Faktor in Hepatozyten beschrieben (Akira et al. 1994). Während STAT3 eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen wie Zellentwicklung und Differenzierung spielt, kann die abnormale Expression von STAT3 nicht nur onkogene Wirkungen haben, sondern auch zu verschiedenen immunologischen Krankheitsbildern, beispielsweise SCID (severe combined immunodeficiency syndrome) oder das Hyper-IgE-Syndroms, führen (O'Shea et al. 2013; Casanova et al. 2012).

#### 1.6.1 Der JAK-STAT3 Signalweg

Der JAK2-STAT3-Signalweg (Abb. 4) kann durch verschiedene Liganden aktiviert werden, eine besondere Rolle spielt hier allerdings Interleukin-6. Durch die Bindung an Interleukin-6-Rezeptoren wird die Phosphorylierung und Dimerisierung von gp130 ermöglicht. Dadurch kommt es ebenfalls zur Dimerisierung und Phosphorylierung der gp130-assoziierten Januskinasen (JAK). Anschließend wird zytoplasmatisches STAT3 rekrutiert und ebenfalls phosphoryliert. Diese Phosphorylierung findet am Tyrosin 705 (Y705) statt und ermöglicht die Dimerisierung der phosphorylierten STAT3-Monomere. Das STAT3-Dimer transloziert anschließend in den Nukleus der Zelle. Dort induziert STAT3 je nach Zelltyp die Transkription pro-proliferativer, anti-apoptotischer sowie verschiedener immunologischer Gene (Wang et al. 2011; Siveen et al. 2014; Grivennikov & Karin 2010).



**Abbildung 4: JAK-STAT3-Signalweg.** Interleukin-6 bindet am Rezeptor, was zur Phosphorylierung und Dimerisierung von gp130 führt und folglich zur Dimerisierung und Phosphorylierung der gp130- assoziierten Januskinasen (JAK). Dadurch wird zytoplasmatisches STAT3 rekrutiert und am Tyrosin 705 (Y705) ebenfalls phosphoryliert, was die Dimerisierung derselben ermöglicht. Das STAT3-Dimer wandert anschließend in den Nukleus der Zelle und kann dann transkriptionell aktiv werden. Darstellung vereinfacht und modifiziert (Corcoran et al. 2011; Yu et al. 2009).

### 1.6.2 Die Rolle von STAT3 in Neoplasien

Die ersten Hinweise auf eine Rolle in der Entstehung und dem Progress von Neoplasien von STAT3 leitete sich aus der Entdeckung ab, dass STAT3 bei Patienten mit verschiedenen Malignitäten überexprimiert wird (Yu et al. 1995; Migone et al. 1995). STAT3 spielt nicht nur eine entscheidende Rolle in der Entstehung einiger hämatologischer Tumoren und ist beispielsweise in 40% der Large Granular Lymphocyte Leukämien (T-LGL-Leukämie) überexprimiert, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass STAT3 in soliden

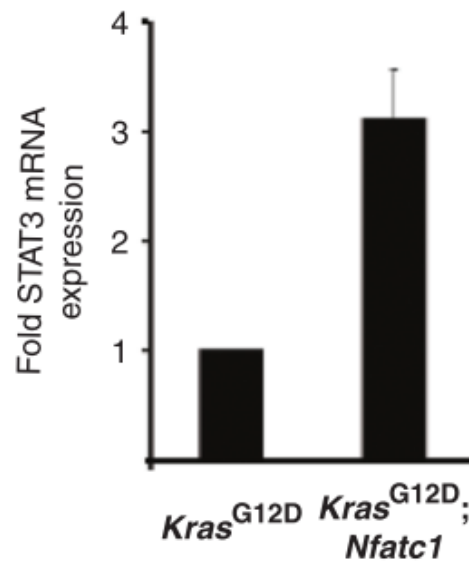
Tumoren wie Magen- oder Kolonkarzinom überaktiviert wird (Koskela et al. 2012; Yu et al. 2009; Grivennikov & Karin 2010; Bromberg 2002).

### 1.6.3 Die Rolle von STAT3 im Pankreaskarzinom

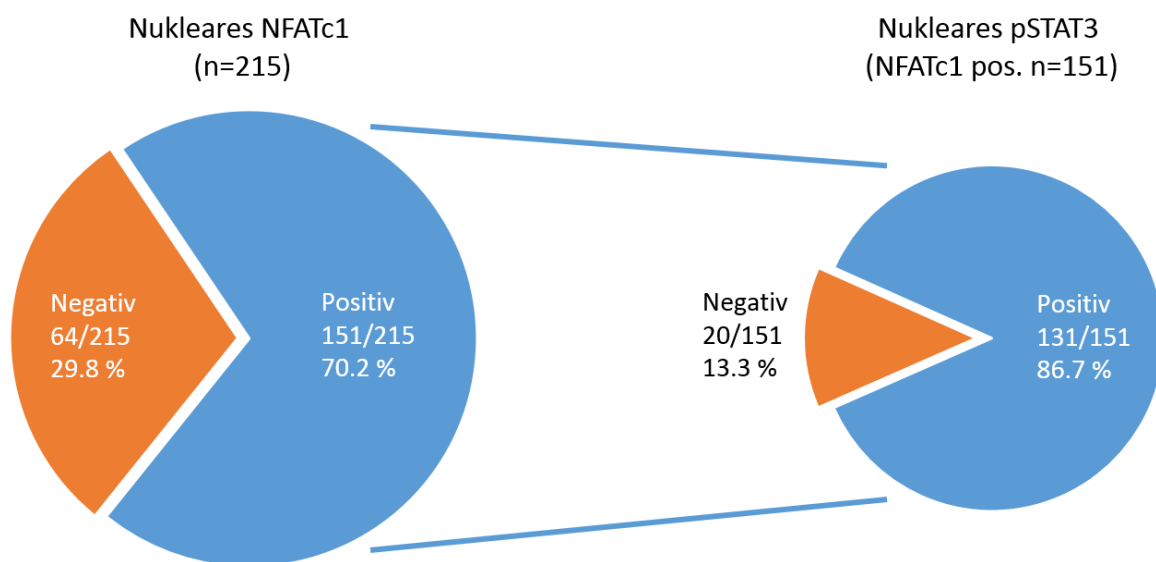
Im gesunden Pankreasgewebe liegt STAT3 in der Regel als inaktive, nicht am Tyrosin 705 phosphorylierte, Variante vor. Während der normalen Entwicklung des Pankreas ist der STAT3-Signalweg inaktiv und wird auch nicht für die regelgerechte Funktion des Pankreas benötigt. Dies konnte in transgenen Mäusen mit konditionaler STAT3-Inaktivierung gezeigt werden (Lee & Hennighausen 2005). Verschiedene Arbeiten aber haben gezeigt, dass in 30-100% der humanen Pankreaskarzinome ein konstitutiv aktiviertes STAT3 (pSTAT3<sup>Y705</sup>), messbar durch die Phosphorylierung an Tyrosin 705, exprimiert wird (Toyonaga et al. 2003; Scholz et al. 2003) und dass STAT3 in der inflammations-getriggerten Pankreaskarzinogenese eine wichtige Rolle spielt (Lesina et al. 2011; Fukuda et al. 2011; Baumgart et al. 2014). Auch wenn die Mechanismen, die zur Entstehung von PanINs führen, noch nicht eindeutig verstanden sind, lässt sich bereits darstellen, dass STAT3 ebenfalls eine wichtige Rolle in der azinär-duktalen Metaplasie (ADM) sowie in der Entstehung von PanINs spielt, da ein STAT3-Knockout bei gleichzeitiger KRAS Aktivierung zu einer deutlich verlangsamten Entstehung von ADMs und PanINs führt (Corcoran et al. 2011; Lesina et al. 2011).

## 1.7 NFATc1 und STAT3 im Pankreaskarzinom

Aufgrund der beschriebenen onkogenen Funktionen von NFATc1 und STAT3 in der Inflammations-getriggerten Pankreaskarzinogenese untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Interaktion von NFATc1 und STAT3 in der Entstehung und der Progression des Pankreaskarzinoms. Die Analyse der KRAS<sup>G12D</sup>; NFATc1<sup>+/-wt</sup>-Tumoren verglichen mit den KRAS<sup>G12D</sup>-Wurfgeschwistern ergab eine deutlich erhöhte STAT3-Aktivität in Ersteren (Abb. 5) (Baumgart et al. 2014). In humanen Pankreaskarzinomen wiesen 86,7% (131/151) der NFATc1-positiven Pankreaskarzinome auch eine nukleäre Expression von pSTAT3 auf (Abb. 6), was eine funktionelle Kooperation beider Transkriptionsfaktoren in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms suggeriert (Baumgart et al. 2014).



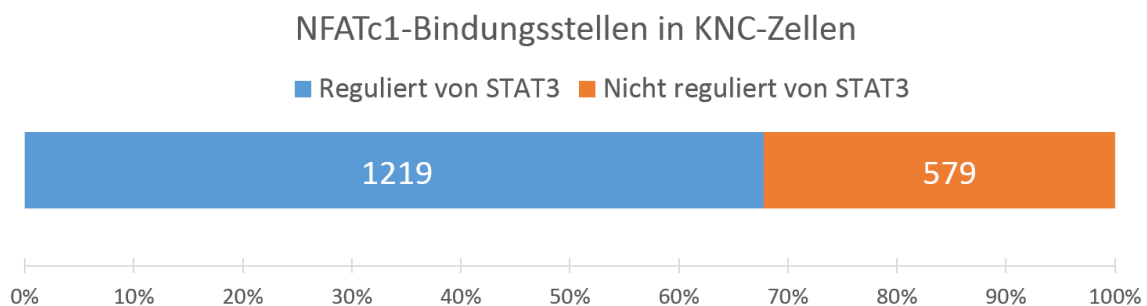
**Abbildung 5: STAT3 ist in transgenen p48-Cre; KRAS<sup>G12D</sup>; NFATc1-Mäusen überexprimiert.** Vergleich der STAT3mRNA-Expression in Lysaten aus Pankreata von p48-Cre;KRAS<sup>G12D</sup>; NFATc1<sup>+/wt</sup> und p48-Cre;KRAS<sup>G12D</sup>-Mäusen (Baumgart et al. 2014).



**Abbildung 6: Statistische Illustration der Expression von nukleärem NFATc1 sowie der nukleären Expression von pSTAT3 bei NFATc1-positiven Mäusen durch Tissue Microarray.** (TMA, n = 215 Patienten mit Pankreaskarzinom), neu gelayoutet und übersetzt (Baumgart et al. 2014).

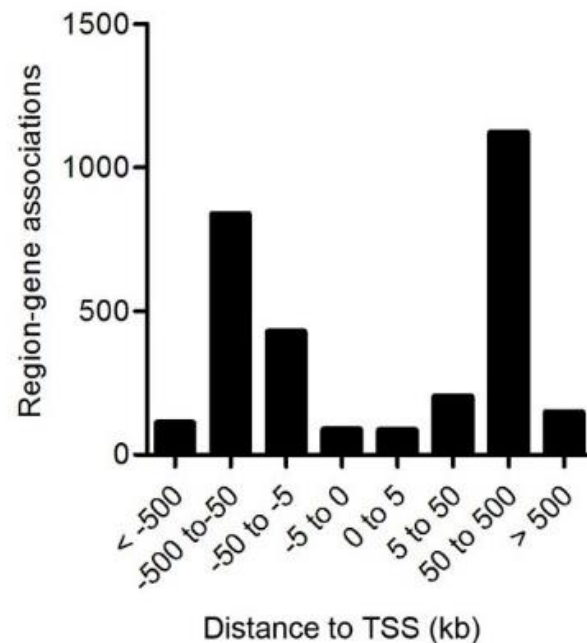
## 1.8 Die Interaktion von NFATc1 und STAT3 am Genom

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine biochemische und funktionelle Interaktion von NFATc1 und STAT3 in der Pankreaskarzinogenese und Progression. In genomweiten Bindungsstudien (ChIP-Seq) in primären Pankreaskarzinomzellen aus NKC-Mäusen (KRAS<sup>G12D</sup>; NFATc1<sup>+/-</sup>; p48(Pdx1)-Cre, im weiteren Verlauf NKC-Zellen genannt) in der Anwesenheit und Abwesenheit von STAT3 wurden STAT3-abhängige NFATc1-Zielgene identifiziert (Baumgart et al. 2014). Von den insgesamt 1798 NFAT-Peaks zeigten etwa Zweidrittel eine Reduktion der NFATc1-Bindung nach STAT3-Verlust (Abb.7). Diese Daten weisen auf eine enge funktionelle Kooperation der NFATc1- und STAT3-Signalwege im Pankreaskarzinom hin (Baumgart et al. 2014).



**Abbildung 7: ChIP-seq-Analyse ergibt eine STAT3-abhängige DNA-Bindung von NFATc1 in 1219 von 1798 Fällen (67.8%).** Neu gelayoutet und übersetzt (Baumgart et al. 2014).

Weiterhin wurde im Rahmen der ChIP-Seq auch die Distanz der NFATc1-Bindung zu den Startpunkten der Transkription untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass NFATc1 primär an Stellen am Genom bindet, die sich zwischen 50-500 Basenpaaren distal oder proximal des Transkriptionsstarts (TSS) befinden (Abb. 8) (Baumgart et al. 2014).



**Abbildung 8: NFATc1 bindet vermehrt distal des Startorts der Transkription (TSS).** Die Grafik zeigt, dass die NFATc1-Peaks vermehrt an Stellen zwischen 50 und 500 Basenpaare entfernt des Startorts der Transkription liegen. Dabei können diese Peaks sowohl vor der Transkriptionssequenz, nach der Transkriptionssequenz oder innerhalb derselben liegen (Baumgart et al. 2014).

## 1.9 Enhancer und Promotorregionen

Nur ein geringer Prozentsatz, etwa 1-2 Prozent, des menschlichen Genoms werden transkribiert. Ein signifikanter Anteil der DNA hat regulatorische Funktionen inne und beeinflusst die Transkriptionsaktivität benachbarter oder weiter entfernt liegender Gen-signaturen (Elgar & Vavouri 2008). Eine Gruppe dieser wichtigen regulatorischen Sequenzen sind die Enhancer. Bei einem Enhancer handelt es sich um einen Genabschnitt, der durch Transkriptionsfaktoren und andere Proteine gebunden und aktiviert werden kann und konsekutiv durch distale Regulationsmechanismen wie Loop-Formationen die Transkription eines Zielgens fördern kann (Ong & Corces 2012; Creyghton et al. 2010). Dabei liegt die Enhancerregion nicht zwangsläufig vor dem Promotor des Zielgens, sondern in der Regel innerhalb proximaler oder distaler Intronregionen (Ong & Corces 2012; Creyghton et al. 2010).

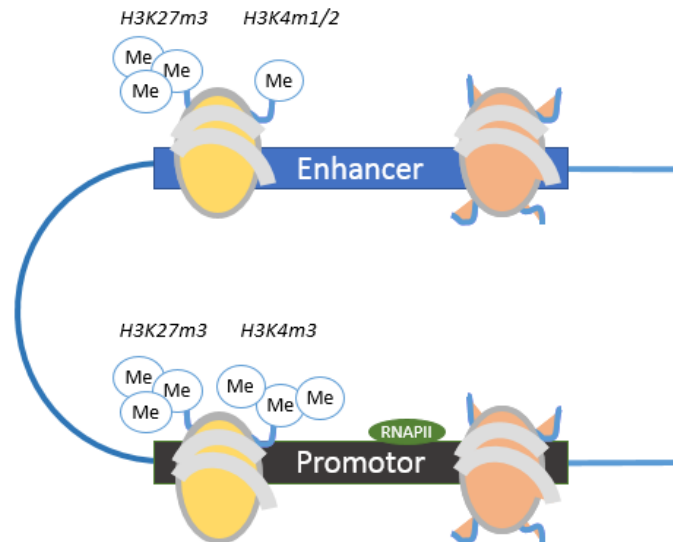


Enhancerregionen zeichnen sich jedoch nicht durch eine spezifische DNA-Sequenz aus, sondern unterscheiden sich vom Rest des Genoms durch spezifische Histonmodifikationen. Als Histon bezeichnet man basische Proteine, die als Bestandteil des Verpackungssystems für eukaryotische DNA fungieren und maßgeblich die transkriptionelle Aktivität eines Genabschnitts bestimmen. Dabei sind im verpackten Zustand 147 DNA-Basenpaare um ein Histon-Oktamer gewickelt, welches aus jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht (Luger et al. 1997). Posttranslationale Modifikationen an diesen Histonen determinieren verschiedene strukturelle und funktionale Chromatin-konformationen (Strahl & Allis 2000). Während einige Histonmodifikationen eine offene Chromatinstruktur (Euchromatin) ermöglichen, die es der Transkriptionsmaschinerie erlaubt, DNA zu binden, bewirken andere Modifikationen hingegen eine Kondensation des Chromatins und somit eine transkriptionelle Repression der lokalen Gensignatur (Strahl & Allis 2000). Die Zusammensetzung verschiedener Histonmodifikationen im Bereich eines Genabschnitts wird als Histon-Code bezeichnet und bestimmt in ihrer Gesamtheit den Aktivitätsgrad seiner Transkription (Strahl & Allis 2000; Biterge & Schneider 2014).

Auch im Bereich der Enhancerregionen finden sich Histonmodifikationen, die auf den Aktivitätsgrad des Enhancers schließen lassen (Creyghton et al. 2010). Enhancerregionen zeichnen sich durch eine Mono- oder Dimethylierung von Histon 3 an Lysin 4 (H3K4me1/me2) sowie eine Trimethylierung von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27me3), welche man allerdings auch an Promotoren findet, aus (Ong & Corces 2012; Creyghton et al. 2010). Wird die Enhancerregion aktiviert, so führt dies zu einer Acetylierung von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27ac), beispielsweise durch die Acetyltransferase p300. Dadurch entsteht eine offene Chromatinstruktur, die die RNA-Polymerase II dazu befähigt, am Transkriptionsstart zu binden und die Transkription zu initiieren (Abb. 9 & Abb. 10) (Baumgart et al. 2014; Creyghton et al. 2010; Herz et al. 2014; Ong & Corces 2012).

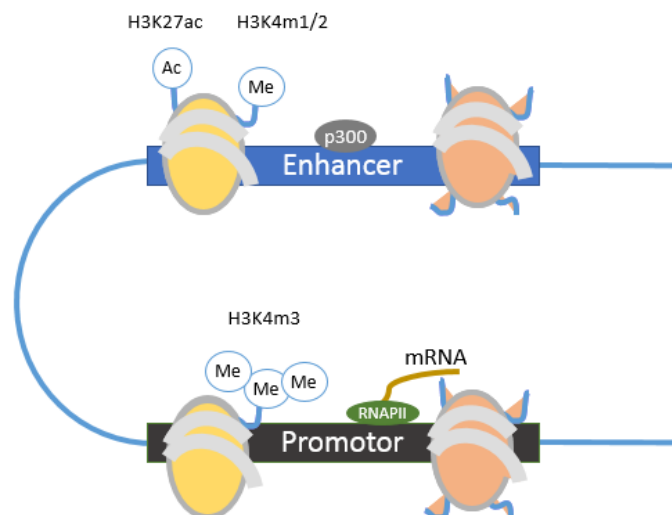
Um nach der Bindung an einem Enhancer die Genregulation zu beeinflussen, benötigt es einer Interaktion mit dem Promotor des Zielgens, der direkt vor dem Transkriptionsstart sitzt. Aktive Promotorregionen zeichnen sich durch die häufige Histonmodifikation H3K4me3 aus (Abb. 9 & Abb. 10) (Baumgart et al. 2014; Creyghton et al. 2010; Herz et al. 2014; Ong & Corces 2012).

### Inaktiver Enhancer & Promotor



**Abbildung 9: Schematische Darstellung inaktiver Enhancer und Promotor.** Es findet keine Transkription durch die RNA-Polymerase II (RNAPII) statt; Me: Methylierung, modifiziert, vereinfacht und übersetzt (Ong & Corces 2012).

### Aktiver Enhancer & Promotor



**Abbildung 10: Schematische Darstellung aktiver Enhancer und Promotor.** Es findet Transkription durch die RNA-Polymerase II (RNAPII) statt, Me: Methylierung, Ac: Acetylierung, modifiziert, vereinfacht und übersetzt (Ong & Corces 2012).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Patienten mit der Diagnose eines Pankreaskarzinoms haben in der Regel eine sehr schlechte Prognose (Krebsdaten 2015). Besonders die Grundlagen der Entstehung des Pankreaskarzinoms sind noch nicht ausreichend erforscht. Zahlreiche Arbeiten haben bis zu diesem Zeitpunkt gezeigt, dass sowohl STAT3 als auch NFATc1 früh in der Pankreaskarzinogenese exprimiert werden und auch in der weiteren Progression des Pankreaskarzinoms wichtige onkogene Funktionen kontrollieren (Buchholz et al. 2006; Mancini & Toker 2009; Shou et al. 2015; Siveen et al. 2014). Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass NFAT mit anderen onkogenen Transkriptionsfaktoren, beispielsweise auch STAT3, interagiert und mit diesen DNA-bindende Komplexe bildet (Buchholz & Ellenrieder 2007; Baumgart et al. 2014; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010).

Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, zu untersuchen, wie und wo NFATc1 und STAT3 im Pankreaskarzinom interagieren und welchen Einfluss dies auf die weitere Progression dieser Neoplasie hat. Dabei soll besonders folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

- Wo binden NFATc1 und STAT3 am Genom und welche Auswirkungen haben diese verschiedenen Bindungen auf die Transkription ausgewählter gemeinsamer onkogener Zielgene?
- Wie kontrollieren NFATc1 und STAT3 ihre DNA-Bindungen gegenseitig? Unterliegt die STAT3/NFATc1-abhängige Genregulation im Pankreaskarzinom der Kontrolle des IL-6-Signalwegs?
- Welchen Einfluss hat der transgene Verlust von STAT3 auf die NFATc1-abhängige Pankreaskarzinogenese und Pankreaskarzinomprogression *in vivo*?

## 3 Material

### 3.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
5100 Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“	Nalgene Labware (Wiesbaden)
Autoklav	Stiefenhofer (München)
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Brutschrank	Heraeus Instruments (Dreieich)
DL Ready™ Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Einbettstation	Reichert-Jung
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific (Dreieich)
Feinwaage Mettler AE163 Precision Plus	Mettler-Toledo GmbH (Gießen) Ohaus (New Jersey, USA)
Finnpipette	Thermo Scientific (Dreieich)
Gasbrenner Labogaz 470	Campingaz (Moskau, Russland)
Geldokumentationssystem Gel Print 1000i  Intas ChemoCam	BioPhotonics Corporation (East Lansing, Michigan, USA)  Intas (Göttingen)
Inkubator	Memmert (Bäch, Schweiz)
Laborautoklav Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer (Breda, Niederlande)
Magnetrührer MR 2000	Heidolph Instruments (Schwabach)
Markerstift, Super PAP Pen	Life Technologies (Darmstadt)
Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskopkamera, DFC 290	Leica (Wetzlar)

Gerät	Hersteller
Mikrotiterplattenphotometer Multiskan FC	Thermo Scientific (Dreieich)
Mikrotom	Leica
Multiskan FC Microplate Photometer	Thermo Scientific (Dreieich)
NanoDrop 1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Paraffinspender/Ausgießstation	Reichert-Jung
Paraffinstreckbad	Medax (Kiel)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Pipetten	Discovery (Langenfeld) Gilson (Limburg)
Power Supply PowerPac Basic Feathervolt 500 Power 300	Bio-Rad (München) Fischer-Scientific (Schwerte) Stratagene (Heidelberg)
Präparationsbesteck	Isolab (Wertheim)
Real-time PCR Maschine 7500 Fast Real-Time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems (Dreieich) Applied Biosystems (Dreieich)
Schüttelplatte KS 250	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Stickstofftank	Tec-lab (Idstein)
Thermoblöcke Digi-Block Thermoblock Dri-Block DB2 Thermomixer 5436	Vertrieb durch NeoLab, Heidelberg Techne AG (Jahnsdorf) Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Thermocycler2720 Thermal Cycler T100 Thermal Cycler	Life Sciences Solution (Carlsbad, USA) Bio-Rad (München)
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph Instruments (Schwabach)

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Vortexgeräte REAX 2000 MS2 Minishaker	Heidolph Instruments (Schwabach) IKA (Staufen)
Wärmeplatte für Objektträger	Medax (Kiel)
Wasserbad	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Western Blot Kammer Mini-PROTEAN Tetra System	Biorad (München)
Zählkammer (Hämozytometer) Neubauer improved	Vertrieb durch Carl Roth (Karlsruhe)
Zentrifugen  Picofuge Biofuge Pico Megafuge 1.0R Labofuge GL Multifuge 3SR+ Mikro 200R Centrifuge 5415 C	  Stratagene (Heidelberg) Heraeus Instruments (Dreieich) Heraeus Instruments (Dreieich) Heraeus Instruments (Dreieich) Heraeus Instruments (Dreieich) Hettich (Tuttlingen) Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)

Tabelle 2 - Laborgeräte

### 3.2 Materialien

<b>Materialien</b>	<b>Firma</b>
2ml Kryoröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Deckgläschen	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einbettringe	Microm International (Walldorf)
Einwegnadeln, Spritzen	Greiner-Bio-One (Frickenhausen)
Geltaschenkamm	Thermo Scientific (Dreieich)
Glaswaren	Schott (Mainz)
Kultivierungsplatten	Thermo Scientific Nunc (Langenselbold)
Mikrotomklingen R35	A. Hartenstein (Würzburg)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Ohrmarken	A. Hartenstein (Würzburg)
Ohrmarkenzange	A. Hartenstein (Würzburg)
Parafilm	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Petrischale 3 cm, 10 cm, 20 cm	Thermo Scientific Nunc (Langenselbold)
Pipetten - 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl - 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) Sarstedt (Nürnberg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Polypropylengefäße (15ml, 50ml)	Greiner-Bio-One (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2 ml)	Sarstedt (Nürnberg), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Whatman Gel Blotting Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturflasche (50, 250, 500ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturschale (60mm, 90mm)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellschaber	Sarstedt (Nürnberg)

Tabelle 3 – Materialien

### 3.3 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Aqua dest. (steril), Aqua ad iniectabilia	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg)
Borsäure	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Citrat	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Complete	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Diaminbenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogene (Karlsruhe)
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt, absolut)	Otto Fischar GmbH & Co KG (Saarbrücken)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethylenglykolbis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)



<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Formaldehyd	Carlo Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycerin (87%)	Carlo Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycin	Carlo Roth GmbH (Karlsruhe)
Hämalaun, sauer nach Mayer	Waldeck GmbH & Co. (Münster)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Interleukin 6	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Kälberserumalbumin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Midori Green	Nippon Genetics Europe GmbH (Düren)
Milchpulver	SIGMA (Deisenhofen)
Natriumbicarbonat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Natronlauge	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
NP40	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Passive Lyse Puffer für Reporter Assay	Promega (Madison, USA)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Ponceaurot	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Proteaseinhibitor-Tabletten (Complete mini)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Protein A-Agarose	Upstate (Schwalbach)
Protein G-Agarose	Upstate (Schwalbach)
Proteinase K (20mg/ml)	Upstate (Schwalbach)
Rnase freies Wasser	Ambion (Chaedle, UK)
Roticlear	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Salmon Sperm	Invitrogen (Karlsruhe)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
SiLentFect	BioRad (München)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe)
Stop-and-glow-Puffer	Promega (Mannheim)
Stop-and-glow-Substrat	Promega (Mannheim)
Streptavidin-Agarose-Beads	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
SYBR® Green	Applied Biosystems (Darmstadt)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris Base (0,2M, 0,25M, 1,5M)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
TRIS	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Tween®20	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Western Lightning Plus-ECL	Perkin Elmer (USA)
Xylenes (Xylol)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)

Tabelle 4 – Chemikalien

### 3.4 Standards, Kultivierungsmedien und Zusätze

Name	Hersteller
Gene Ruler <sup>TM</sup> 100/1000bp ladder	Fermentas GmbH (St.Leon-Roth)
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained	Fermentas GmbH (St.Leon-Roth)
1x PBS	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
1x Trypsin/EDTA	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Penicilin/Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
DNase I incubation buffer	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
DNase I (RNase free)	New England Biolabs (Frankfurt/Main)

Tabelle 5 - Standards, Kultivierungsmedien und Zusätze

### 3.5 Kits

Name	Hersteller
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Promega (Mannheim)
NucleoSpin® Plasmid	Machery-Nagel GmbH (Düren)
Omniscript® Reverse Transriptase Kit	Qiagen (Hilden)
PCR purification kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Picosirius Red Stain Kit	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega (Mannheim)

Tabelle 6 - Kits

### 3.6 Vektoren und Konstrukte

<b>Vektor/Konstrukt</b>	<b>Detailinformation</b>
MSCV-caNFATc1	Insert: caNFATc1  Vektor: MSCV-GFP Clipstone, N.A.
RCAN1	Insert: RCAN1 Promotor  Vektor: pGL3basic Reporter: Luciferase Dundee cell products
RCAN1 + enhanc. NFATmut	Insert: RCAN1 Promotor + enhancer 26 NFATmut  Vektor: pGL3basic Reporter: Luciferase Dundee cell products
RCAN1 + enhanc. RCAN1 Promotor	Insert: RCAN1 Promotor + enhancer 26  Vektor: pGL3basic Reporter: Luciferase Dundee cell products
pCMV2C	Primer: T3;T7 Tag: Flag Stratagene
STAT3 f.l.	Vektor: PEF6-V5 Tag: V5 Referenz: J Biol Chem. 2008 November 7; 283(45): 30725-30734, A.R. Brasier

Vektor/Konstrukt	Detailinformation
wt STAT3	Referenz: Mapping of STAT3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and STAT3. Nucleic Acids Res. 1997;25:2062–7
STAT3 Y705F	Referenz: Mapping of STAT3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and STAT3. Nucleic Acids Res. 1997;25:2062–7

Tabelle 7 - Vektoren und Konstrukte

### 3.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
EcoRI	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Oligo-dT-Primer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen (Karlsruhe)
SUPERaseIN™ RNase Inhibitor	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermo-Start Taq-DNA-Polymerase	Abgene (Hamburg)

Tabelle 8 - Enzyme

### 3.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide	Detailinformation
Silencer® Negative Control siRNA	Applied Biosystems (Darmstadt)
siSTAT3	Maus Sense: 5'-GAGUUGAAUUAUCAGCUUATT-3' Antisense: 5'UAAGCUHAUAAUUC AACUCAG-3' Applied Biosystems (Darmstadt)
siNFATc1	Maus Sense: 5'GGUGGAAGACGUACUCCU-3' Antisense: 5'AGGAAGUACGUCUCCACCTC-3' Applied Biosystems (Darmstadt)

Tabelle 9 – Oligonukleotide

### 3.9 Puffer

Alle hier dargestellten Puffer wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und bei Bedarf zusätzlich steril filtriert oder autoklaviert.

#### 3.9.1 Lysepuffer für DNA-Aufbereitung

##### PBND (PCR Buffer with nonionic detergents)

50mM	KCl
10mM	Tris-HCl (ph 8,3)
2,5mM	MgCl <sub>2</sub>
0,1 mg/ml	Gelatine
0,45% v/v	NP40
0,45% v/v	Tween20

Das PBND wurde anschließend autoklaviert und in kleinen Aliquots bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### 3.9.2 Zelllysepuffer

50 mM	HEPES ph 7.5
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
10 %	Glycerol
1 %	TritonX-100
100 mM	NaF
10 mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O

Zusätzlich wurde zu je 1 ml Lösung 40ul 25x Complete und 10ul PMSF (100 mM) frisch hinzugegeben vor der Verwendung.

### 3.9.3 Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### Trenngelpuffer

1,5 mM	Tris-Base (pH 8,8)
0,4 %	SDS

#### Trenngellösung für 2 Gele

11ml	Trenngelpuffer
23µl	APS 10%
23µl	TEMED

#### Stoppgellösung für 2 Gele

750µl	Trenngelpuffer
5µl	APS 10%
5µl	TEMED

#### Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris-Base (pH 6.6)
0,4 %	SDS

#### Sammelgellösung für 2 Gele

4ml	Sammelgelpuffer
15µl	APS 10%
9µl	TEMED

#### Laufpuffer (10x)

288 g	Glycin
60,6 g	Tris
20 g	SDS



Der 10x Laufpuffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 2 Liter verdünnt.

#### Laufpuffer (1x)

100ml	Laufpuffer 10x
900ml	destilliertes Wasser

### 3.9.4 Puffer für Western Blot

#### 10x Transblotpuffer

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin

#### 1x Transblotpuffer

100 ml	10x Transblotbuffer
200 ml	Methanol
700 ml	destilliertes Wasser

### 3.9.5 Puffer zum Entwickeln und Waschen der Nitrocellulosemembran

#### 10x TBS – Puffer

0,2 M	Tris
1,37 M	NaCl

1x TBST – Puffer

100 ml	10x TBST-Puffer
900 ml	destilliertes Wasser
1 ml	Tween 20

Blocking-Puffer

100 ml	1x TBST
5 g	Milchpulver

Bradford Protein Assay

50 ml	BioRad Protein Assay
200 ml	destilliertes Wasser

3.9.6 Puffer für Agarose-Gel-ElektrophoreseTBE-Puffer (1x)

10,8 g	Tris
5,5 g	Borsäure
0,37 g	EDTA

Der TBE-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt.

1% Agarose Gel

0,5 g	Agarose
50 ml	TBE-Puffer
0,8 µl	Ethidiumbromid oder Midori Green

### 3.9.7 Puffer für Chromatinimmunopräzipitation

#### Waschpuffer 1

20 mM	Tris (pH 8,1)
150 mM	NaCl
2 mM	EDTA
0,1%	SDS
0,1%	Triton X-100

#### Waschpuffer 2

20 mM	Tris (pH 8,1)
500 mM	NaCl
2 mM	EDTA
0,1%	SDS
0,1%	Triton X-100

#### Waschpuffer 3

20 mM	Tris (ph 8,1)
250 mM	LiCl
1 mM	EDTA
1 %	NP40
1 %	SDS

#### Lyse-Puffer 1

5 mM	Tris (ph 8)
85 mM	KCl
0,5 %	NP 40

RIPA Puffer

1 M	Tris (pH 7,4)
5 M	NaCl
10%	Triton X-100
5 g	Natrium-Deoxycholat
0,25 M	EDTA
0,2 M	EGTA (pH 7,2)

TE-Puffer

20 mM	Tris (pH 8,0)
1 mM	EDTA

Elution-Puffer

500 µl	20% SDS
1 ml	1 M NaHCO <sub>3</sub>

Der Elution-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt.

Reversion-Puffer

5 M	NaCl
1M	Tris (pH 6,5)
0,5 M	EDTA
20 µg	Proteinase K
10 µg	RNase A

### 3.9.8 Puffer für Immunhistochemie

#### Citratpuffer

2,1 g                      Citronensäure-Monohydrat

Der Citratpuffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l verdünnt.

#### PBS (pH 7,4)

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,765 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O

PBS wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l verdünnt.

#### TE- Puffer (10x)

12,1 g	Tris-Base
3,7 g	EDTA

Der TE-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l verdünnt.

#### Diaminobenzidin (DAB)

200 mg	DAB
200 ml	TBS
100 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 3.9.9 Sonstige Puffer

#### 5x Lämmli

1M Tris/HCl	225mM
100% Glycerin	50%
20% SDS	5%
1M DTT	100mM
Bromphenolblau	0,02 %

Direkt vor der Anwendung wurde 5x Lämmli je nach Bedarf noch mit destilliertem Wasser auf 2x oder 1x Lämmli verdünnt. Ebenso wurde dem Ansatz kurz vor Gebrauch 5% 2-Mercaptoethanol hinzugegeben.

## 4 Methoden

### 4.1 Zuchtmäuse

#### 4.1.1 Zuchtlinien

Zur Bestätigung der Arbeitshypothesen arbeiteten wir in der Arbeitsgruppe mit verschiedenen transgenen Mausmodellen. Alle Mäuse wurden nach den Richtlinien und Protokollen der Tierschutzkommission der Universität Marburg gehalten.

Die Mäuse wurden in der Regel so verpaart, dass ein Männchen zusammen mit zwei Weibchen in einem Käfig war, um die Jungtierrate möglichst groß zu halten. Die Jungtiere wurden nach 14 Tagen durch das Anbringen eines Ohrclips mit fortlaufender Nummer individualisiert und ein Stück des Schwanzes zur Bestimmung des Genotyps gewonnen. Nach Ermittlung des Genotyps wurden die für weitere Versuche oder die Beobachtung geeignete Zuchttiere aus dem Elternkäfig entfernt, die Jungtiere ohne den geeigneten Genotyp wurden für die Tierpfleger auf der Käfigkarte markiert und von diesen dann aus dem Käfig entfernt und mit Kohlenstoffdioxid euthanasiert.

Für die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Versuche wurde eine Reihe konsequenter Kreuzungen unter Beachtung der mendelschen Erbgregeln durchgeführt, um die gewünschte genotypische Zusammensetzung der Mäuse zu erreichen.

Als Grundlage für die Versuche galten heterozygote LSL-KRAS sowie Mäuse mit konstitutiv aktivem NFATc1 (c.a.NFATc1 bzw. NFATc1<sup>+/wt</sup>). Beide Mutationen konnten durch die Verwendung der pdx-Cre-Rekombinase pankreasspezifisch aktiviert werden. Dadurch entstand die „NKC-Maus“, eine Maus mit pankreasspezifischer KRAS-Mutation wie auch Überexpression von NFATc1. Um die direkte Rolle von STAT3 in der Tumorgenese in diesem Modell weiter zu untersuchen, wurde eine weitere Mutation in diese Maus gekreuzt, jedoch nicht direkt in die NKC-Maus, da diese Maus bereits einen Phänotyp entwickelt hatte.

Daher wählte ich im Rahmen dieser Doktorarbeit einen anderen Ansatz und erlangte durch einige konsequente Verpaarungen eine Maus, die einen heterozygoten STAT3

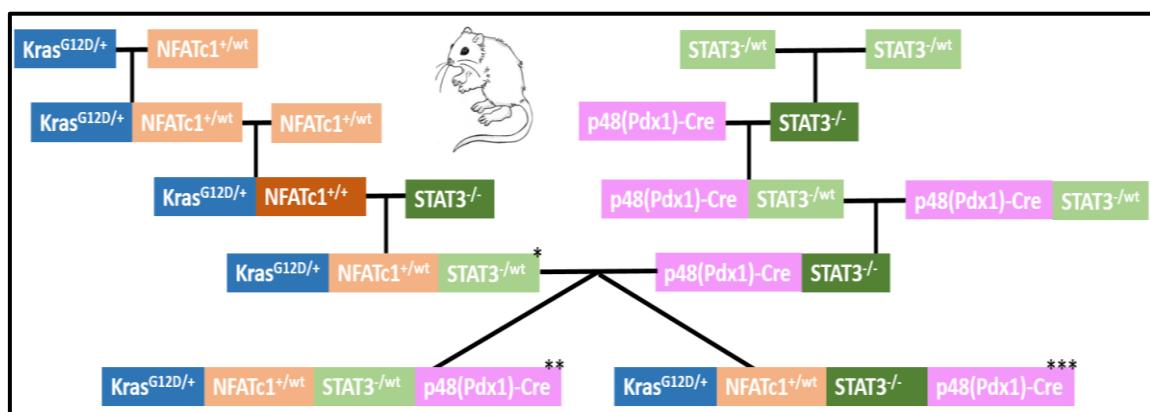
Knockout, ein konstitutiv aktives NFATc1 als auch eine KRAS-Mutation besitzt ( $\text{STAT3}^{-/\text{wt}}$ ,  $\text{NFATc1}^{+/\text{wt}}$ ,  $\text{LSL-KRAS}^{\text{G12D}}$ , in Abbildung 11 mit \* markiert). Diese Maus hatte noch keinen Phänotyp, da ihr die Cre-Rekombinase zur Aktivierung der Mutationen im Pankreas fehlte. Die zweite Maus für die finale Kreuzung war eine homo- oder heterozygote STAT3-Knockout-Maus (in Abbildung 11 ist aus Gründen der besseren Übersicht nur die homozygote STAT3-Knockout-Maus dargestellt) mit gleichzeitiger Expression der Pdx1-Cre - oder p48-Cre-Rekombinase ( $\text{STAT3}^{\text{wt}/-}$ ; p48(Pdx1)-Cre oder  $\text{STAT3}^{-/-}$ ; p48(Pdx1)-Cre). Diese Maus hatte ebenfalls keinen Phänotyp. Daher konnte ich diese beiden Mäuse in Verhältnis 2:1 (w:m) miteinander verpaaren und gelangte so zu den beiden Mausgenotypen, die in dieser Doktorarbeit genauer beschrieben sind.

Diese hatten entweder den Genotyp:

**$\text{STAT3}^{-/-}$ ,  $\text{NFATc1}^{+/\text{wt}}$ ,  $\text{LSL-KRAS}^{\text{G12D}}$ , p48(Pdx1)-Cre**  
(homozygote „KNS“ – Maus, in Abbildung 11 mit \*\*\* markiert)

oder

**$\text{STAT3}^{\text{wt}/-}$ ,  $\text{NFATc1}^{+/\text{wt}}$ ,  $\text{LSL-KRAS}^{\text{G12D}}$ , p48(Pdx1)-Cre**  
(heterozygote „KNS“ – Maus, in Abbildung 11 mit \*\* markiert).



**Abbildung 11: vereinfachtes Kreuzungsschema der verwendeten Mauszüchtlinien.** Die Farben dienen dem einfacheren Verständnis der Kreuzungsvorgänge, dunklere Nuancen der gleichen Farbe symbolisieren eine Homozygotie der Maus für ein bestimmtes Allel.



#### 4.1.2 Opferrung und Präparation der Mäuse

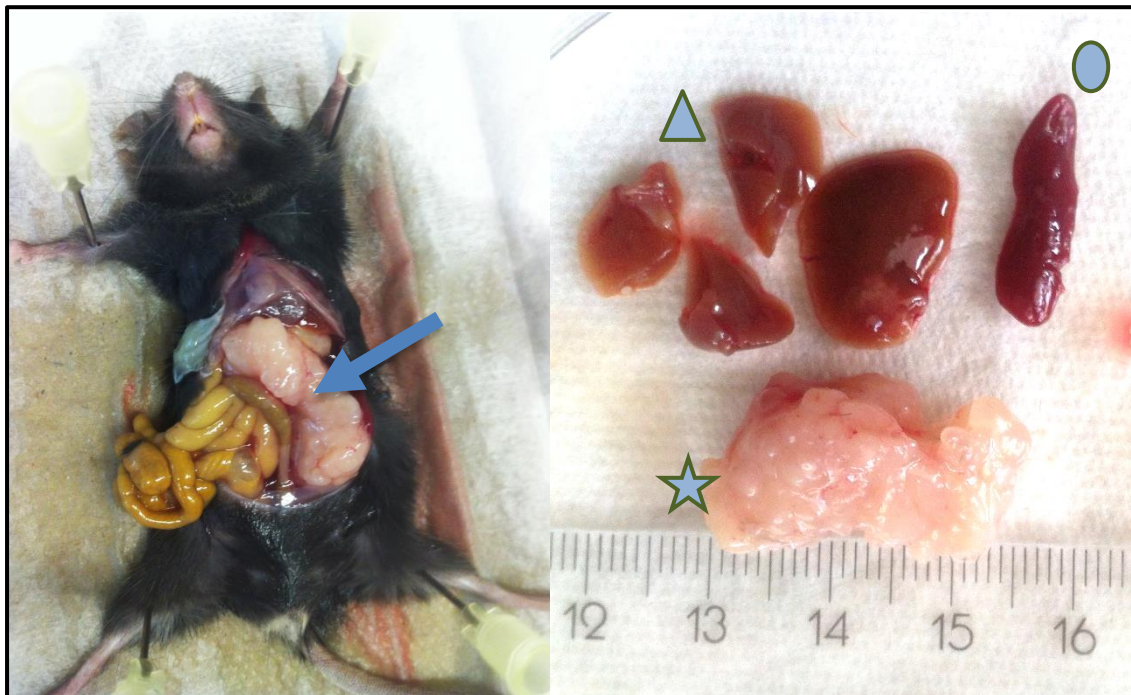
Zur Gewinnung von Gewebematerialien sowie zur Beurteilung des Progresses der Pankreaskarzinome wurden Mäuse verschiedener Genotypen zu bestimmten Zeiten geopfert. Zur Evaluierung der Tumorprogression wurden Mäuse beider Genotypen (homozygote sowie heterozygote KNS-Mäuse) verwendet. Für diese Opferrung mussten die Mäuse zuerst aus dem sterilen Mausstall in einem Transportkäfig ins Labor überführt werden. Dort wurden dann die notwendigen Vorbereitungen zur Präparation der Maus getroffen (Abb. 12).



**Abbildung 12: Beispielhafte Präparationsvorlage für Arbeiten mit Zuchtmäusen.** Von links nach rechts: Styroporunterlage zum Fixieren der Mäuse, Kryokonservierungsröhrchen, Lineal zum Ausmessen der Dimensionen, Petrischalen, kleine Glasgefäße zur Gewebekonservierung, diverses Präparationsbesteck (Scheren und Pinzetten verschiedener Art), sowie Handschuhe für den Präparator. Es fehlt auf dem Bild ein Einmalskalpell, welches bei Bedarf noch zusätzlich verwendet wurde sowie Desinfektionsspray.

Anschließend wurde die Maus durch zervikale Dislokation geopfert, um anschließend zur erneuten Bestätigung des Genotyps mittels PCR erneut ein Stück des Schwanzes zu gewinnen. Vor der Eröffnung des Situs wurde die Maus auf makroskopisch sichtbare äußere Auffälligkeiten untersucht. Zur Stabilisierung der Maus wurde diese mit vier Nadeln auf der Styroporunterlage fixiert um anschließend vorsichtig mit Schere und Skalpell den Situs zu eröffnen. Abbildung 13 zeigt einen repräsentativen Beispielsitus einer geopfert Maus. Der Befund nach eröffnetem Situs wurde photographisch dokumentiert. Anschließend erfolgte bei Bedarf die Entnahme von Pankreasgewebe, Lebergewebe und Milzgewebe. Die entnommenen Gewebestücke wurden zur Vermessung in eine Petrischale mit unterliegendem Lineal gelegt und anschließend repräsentativ zerkleinert, um

sowohl histologische Schnitte anzufertigen als auch die Möglichkeit zu bekommen, DNA, RNA, Proteine sowie Zellen für eine Zellkultur zu gewinnen. Die genauen Erläuterungen dieser Schritte beginnend mit der Gewebeaufbereitung nach Entnahme werden in den jeweiligen Abschnitten im Methodenteil separat beschrieben. Die nicht benötigten Bestandteile der geopferten Maus wurden nach den Hygienerichtlinien fachgerecht entsorgt.



**Abbildung 13: Eröffneter Maussitus und entnommene Organe. (Linkes Bild)** Geöffneter Maussitus zur Evaluation der Abdominalorgane, besonders Pankreas, Leber und Milz. Der deutlich sichtbare Pankreastumor ist mit einem Pfeil markiert. Die Maus ist mit vier Pins an den Extremitäten auf der Styroporunterlage fixiert. Die Feuchtigkeit der Unterlage ist ein Ergebnis der großen Menge Aszites im Bauchraum **(Rechtes Bild)** Entnommener Pankreastumor (Stern) sowie verschiedene Lebersegmente (Dreieck) und Milzanteil (Kreis) aus der gleichen Maus.

## 4.2 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

### 4.2.1 Genotypisierung der verwendeten Mäuse

Um die Mäuse genotypisieren zu können, musste zunächst DNA aus den Probematerialien gewonnen werden. Dazu wurden die Mäuse zwei bis drei Wochen nach Geburt mit Ohrmarken fortlaufender Nummer markiert und eine kleine Probe des Ohres oder des Mausschwanzes, der 5mm nicht überschreiten sollte, mit einer sauberen Schere gewonnen. Mithilfe der Polymerasekettenreaktion und spezifischer Primer wurden die gesuchten DNA-Fragmente anschließend amplifiziert, durch Gelelektrophorese getrennt und unter UV-Licht zur Auswertung sichtbar gemacht.

### 4.2.2 DNA-Extraktion aus Mausgewebeproben

Je nach Alter der Maus wurden die Gewebeproben entweder aus dem Mausschwanz (2-3 Wochen) oder einem der beiden Ohren (älter als 3 Wochen) durch Abschneiden mit der Schere gewonnen. Die Proben wurden im Anschluss einzeln in durchnummerierte Eppendorfgefäße überführt und um jeweils 180ul PBDN sowie 20ul Proteinase-K ergänzt. Anschließend wurden die Proben bei 55 °C im Heizblock unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben am folgenden Tag für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Wurde die Probe direkt für die Genotypisierungs-PCR weiterverwendet, so erfolgte die Zwischenlagerung auf Eis und anschließende endgültige Lagerung bei -20°C.

### 4.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase chain reaction)

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische Sequenzen an genetischem Material (DNA, RNA) in vitro mit dem Enzym DNA-Polymerase amplifiziert werden. Daher ist es möglich, die verwendeten Mäuse auf ihre genetischen Mutationen genau zu untersuchen und eine Auswahl zu treffen, welche Mäuse den korrekten Genotyp für weitere Untersuchungen haben.

Das Verfahren der PCR basiert auf einem wiederholten Ablauf von Zyklen unterschiedlicher Temperatur, währenddessen das DNA-Template durch das Enzym DNA-Poly-

merase künstlich amplifiziert wird. Dieser Prozess von 15-50 Zyklen wird in einem speziellen Thermocycler durchgeführt, der für verschiedene Zwecke unterschiedlich programmiert werden kann. Im Folgenden ist ein beispielhafter Ablauf eines Zyklus erläutert, der in der Regel aus drei charakteristischen Schritten besteht:

#### 1. Denaturierung/ Strangtrennung der DNA:

Durch Erhitzen auf ca. 95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Doppelsträngen gebrochen, die DNA denaturiert und es entsteht Einzelstrang-DNA.

#### 2. Annealing/ Anlage der Primer an die DNA

Im zweiten Schritt der PCR wird das Eluat auf eine für die Primer spezifische Temperatur abgekühlt, die in der Regel zwischen 50 ° und 70 °C. Bei dieser Temperatur können sich die Primer bestmöglich an die gesuchte DNA-Zielsequenz anlegen.

#### 3. Elongation/ Synthese der DNA

Im Anschluss wird die Probe auf 72 °C erhitzt, da bei dieser Temperatur die DNA-Polymerase am besten arbeiten kann. Durch die DNA-Polymerase erfolgt die Synthese der durch die Primer markierten DNA-Abschnitte, entweder bis zum Ende des Einzelstranges oder bis zur erneuten Temperaturänderung im Rahmen des ersten Schrittes der PCR (Denaturierung).

Diese Zyklen werden 20-40 mal wiederholt, sodass bei Vorhandensein einer bestimmten DNA-Sequenz anschließend eine ausreichende Menge Kopien dieses Templates für weitere Analysen vorhanden ist. In der Regel werden die Proben nach Beendigung des Programmes durch den Thermocycler auf 4 °C heruntergekühlt.

#### 4.2.4 Durchführung der Genotypisierungs-PCR

Für die Genotypisierungs-PCR wurden je 2µl Maus-DNA verwendet, die zusammen mit 23 µl Mastermix in ein 0,2 ml Eppendorfgefäß pipettiert wurden. Zur Negativkontrolle dienten eine Probe mit destilliertem Wasser und eine Probe mit Wildtyp-DNA. Zur Positivkontrolle wurden Proben von transgenen Mäusen verwendet, deren Genotyp in der

Vergangenheit zweifelsfrei ermittelt worden war. Die Reaktionsansätze wurden anschließend in den Thermocycler gestellt und mit dem jeweiligen Programm gestartet.

#### PCR-Mastermix

15,25 µl	H <sub>2</sub> O
5 µl	GoTaq Puffer (5x)
1 µl	Primer Forward
1 µl	Primer Reverse
0,5 µl	dNTPs
0,25 µl	GoTaq

Dies ergibt 23 µl Mastermix, die jeweils durch 2 µl des Probeneluats ergänzt wurde.

#### 4.2.5 Verwendete PCR-Primer & Programme für Genotypisierungen

##### Primer für p48Cre-PCR:

p48Cre Primer Forward: 5'- TGC TGT TTC ACT GGT TAT GCG G-3'  
p48Cre Primer Reverse: 5'- TTG CCC CTG TTT CAC TAT CCA G-3'

##### Programm für p48Cre-PCR:

95°C 2min  
29 Zyklen  
    95°C 30sec  
    60°C 30sec  
    72°C 1min  
    72°C 5min

##### Primer für NFAT-PCR:

NFAT Primer Forward 5'- CAT GTC TGG GAG ATG GAA GC-3'  
NFAT Primer Reverse 5'- TCT CGA GCT ACT TGT CAT CG-3'

Programm für NFAT-PCR:

95°C 2min

20 Zyklen

95°C 30sec

60°C 30sec

72°C 1min

72°C 5min

Primer für NFAT-Homozygot-PCR:

Rosa26 Primer Forward 5'- GGC GGA TCA CAA GCA ATA AT-3'

Rosa26 Primer Reverse 5'- GAG TCT TCT GGG CAG GCT TA-3'

Programm für NFAT-Homozygot-PCR:

95°C 2min

34 Zyklen

95°C 30s

65°C 30s

72°C 60s

72°C 2min

Primer für KRAS-PCR:

KRAS Primer For. 5'-AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC G- 3'

KRAS Primer Rev. 5'- CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA -3'

Programm für KRAS-PCR:

95°C 2min

29 Zyklen

95°C 30sec

60°C 30sec

72°C 1min

72°C 5min

Primer für STAT3-PCR:

STAT3 Primer Forward      5'- CCT GAA GAC CAA GTT CAT CTG TGT GAC -3'  
STAT3 Primer Reverse      5'- CAC ACA AGC CAT CAA ACT CTG GTC TCC -3'

Programm für STAT3-PCR:

95°C    2min

35 Zyklen

    95°C    30sec

    58°C    30sec

    72°C    1min

    72°C    5min

4.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des Photometers können Nukleinsäuren quantifiziert werden. Dies geschieht durch eine Bestimmung des gemittelten Extinktionsmaximums der heterozyklischen Basen bei 260 nm und durch das Lambert-Beer-Gesetz. Dieses Gesetz beschreibt die Extinktion (E) als abhängige Funktion des molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), der molaren Konzentration (c) sowie der Schichtdicke der absorbierenden Flüssigkeit, in der sich die Nukleinsäure befindet. (d):  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ . Die Konzentration von DNA- bzw. RNA-Proben wurde durch den NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Zur Bestimmung der Konzentration verwendet man 1,5  $\mu$ l einer Probe und misst die Absorption bei 260 nm und 280 nm. Des Weiteren wird das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm errechnet. Ziel war, dass dieser Wert für DNA über 1,8 und für RNA über 2,0 liegt. Ein geringerer Wert deutet auf eine Kontamination hin, was eine erneute Aufreinigung der Lösung nötig machte.

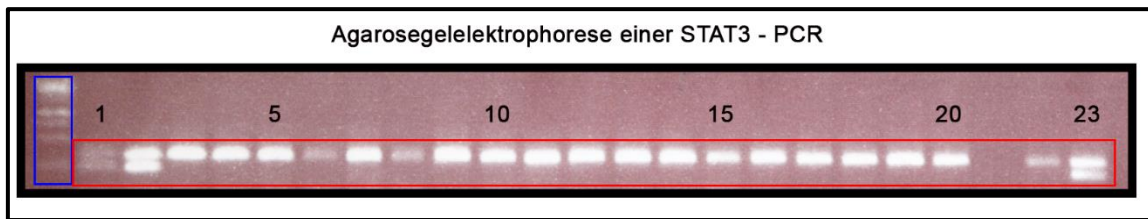
4.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente basiert auf der Ausbreitung der Makromoleküle im elektrischen Feld je nach ihrem Ladungs-Masse-Verhältnis. Dabei ist ihre Mobilität antiproportional zu diesem Verhältnis, was bedeutet, dass schwerere und stärker geladene Makromoleküle in der gleichen Zeit eine kürzere Strecke im Gel

zurücklegen als leichtere und weniger stark geladene Makromoleküle. Durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid oder der Reagenz Midori Green werden die Makromoleküle nach der Gelelektrophorese unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und können so dokumentiert und ausgewertet werden. Die Gele für die Gelelektrophorese wurden in unserer Arbeitsgruppe selbst hergestellt. In der Regel handelt es sich dabei um 1%iges Agarosegel. Die Suspension wurde nach Zusammenmischen bis zum ersten Aufkochen in die Mikrowelle gestellt und anschließend für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zum Auskühlen stehen gelassen. Anschließend wurde entweder Ethidiumbromid (0,8 µg) oder Midori Green (2 µg) zur Suspension hinzugefügt und kurz geschüttelt, damit sich das Reagenz in der gesamten Suspension verteilt. Die fertige Suspension wurde in einen Gelträger gegossen und anschließend direkt ein Kamm mit gewünschter Taschengröße eingesetzt. Nach dem Aushärtungsprozess, der je nach Größe des gegossenen Gels zwischen 15 und 45 Minuten dauern kann, konnte das Gel entweder direkt verwendet werden, oder aber über Nacht in feuchten Tüchern im Kühlschrank gelagert werden, um am folgenden Tag genutzt zu werden.

Die zu analysierenden Nukleinsäureproben wurden dann mit Ladepuffer (5x, 20%) versetzt und 10 µl des Gemisches in jede Geltasche geladen. Ebenso wurde zur späteren Beurteilung der Banden ein geeigneter Marker in eine Geltasche gegen. Die Auftrennung der Makromoleküle erfolgte dann innerhalb von 30-60 Minuten bei einer angelegten Spannung von 120 Volt. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid oder durch Midori Green fluoreszierten die Nukleinsäurebanden bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm. Die Nukleinsäurebanden im Gel wurden hierfür auf einem UV-Leuchttisch dargestellt. Durch den aufgetragenen Marker konnte die Größe der Makromoleküle bestimmt und dadurch zugeordnet werden. Zu Dokumentationszwecken wurde an dieser Stelle auch in Bild des Gels erstellt (Abb.14).





**Abbildung 14: Polaroidbild einer Agarosegelelektrophorese nach STAT3-PCR.** Der blaue Kasten umrahmt den verwendeten Marker, der rote Kasten stellt die auszuwertenden PCR-Banden da. Im verwendeten Beispiel stellt Probe 21 die Negativkontrolle mit Wasser dar, daher ist keine Bande sichtbar. Probe 22 (homozygote Kontrolle) sowie Probe 23 (heterozygote Kontrolle) wurden als Positivkontrolle dieser PCR verwendet. Im verwendeten Beispiel sind Proben 1 & 2 heterozygot für STAT3, alle anderen Proben (3-20) sind homozygot für STAT3. Für die Proben 1,6 und 8 wurde erneut eine PCR durchgeführt, da die Signale nur schwach positiv waren.

#### 4.2.8 RNA-Präparation aus Gewebeproben

Zur RNA-Präparation aus Mauspankreatum wurde Pankreasgewebe in Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die für die Präparation notwendigen RNase-freien Mörser, Schalen, Pinzetten und Skalpelle wurden autoklaviert und auf Trockeneis vorgekühlt. Anschließend wurde je 500 µl Tripure-Reagenz in 1,5 ml Eppendorfgefäße vorgelegt. Das Pankreasgewebe wurde dann mit dem Mörser zerstoßen und das entstehende Pulver mit einem Skalpell in das Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Das Lysat wurde dann mit der Pipette mehrmals auf- und abpipettiert, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und konnte zu diesem Zeitpunkt bei -80°C dauerhaft gelagert werden. Für die weitere Präparation wurden pro Eppendorfgefäß 150 µl Chloroform hinzugegeben, anschließend wurde das Gemisch für 15 Sekunden kräftig gevortext und dann für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde die Probe bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 15 Minuten zentrifugiert. Die farblose Oberphase enthielt die gewünschte RNA und wurde in ein neues Tube überführt, ohne die darunter liegende, RNase enthaltende Phase zu berühren. Zu den Proben wurde 0,7x Volumen Isopropanol hinzugegeben, gevortext und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

#### 4.2.9 Reverse Transkription – die cDNA-Synthese

Um die gewonnenen RNA-Materialien im weiteren Versuchsverlauf mit DNA-Polymerase zu behandeln, war ein Umschreiben der RNA in komplementäre einzelsträngige

DNA (cDNA) notwendig. Dafür wurde die RNAabhängige DNA-Polymerase, eine reverse Transkriptase, verwendet. Hier macht man sich zu Nutze, dass eukaryotische mRNA an ihrem 3'-Ende immer einen Poly-A-Schwanz besitzt. Dieser Schwanz besteht aus mehreren aneinandergereihten Adeninbasen. Daher wird als Primer für diese Reaktion ein Oligo-dT (Thymidin-) Nukleotid verwendet. Der Einsatz dieses Primers ist notwendig, damit die reverse Transkriptase die Reaktion initiieren kann.

Für die cDNA-Synthese wurde das „Omniscript Reverse Transkriptase Kit“ benutzt. Die cDNA-Synthese wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Aus diesem Kit wurde für jeden Ansatz frisch eingesetzt:

2 µl	10x Buffer RT
2 µl	dNTP Mix
0,4 µl	Oligo dt Primer
0,5 µl	RNase Inhibitor
1 µl	Omniscript RT

Der Ansatz wurde um 2 µg RNA ergänzt und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl verdünnt.

Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend durch Inkubation bei 37° C für 90 Minuten.

#### 4.2.10 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Wie bereits im Abschnitt „Polymerasekettenreaktion“ erwähnt, dient die PCR in der Molekularbiologie der Möglichkeit zur Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen, um so die Expression eines bestimmten Gens auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Im Gegensatz zur qualitativen PCR, wie sie bei Genotypisierung durchgeführt wird und für das Ergebnis nur von Bedeutung ist, ob ein bestimmtes Molekül vorliegt, geht es bei der quantitativen Realtime-PCR primär darum, die Konzentration eines Moleküls zu bestimmen. Bei dieser Methode ist es möglich, die exponentiellen RNA-Vervielfältigungen während eines jeden PCR-Zyklus durch eine Fluoreszenzreaktion zu messen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green verwendet, welcher sich an die

amplifizierte DNA anlagert. Jeder Teilschritt der PCR (Teilschritte siehe Abschnitt „Polymerasekettenreaktion“) unterliegt einem exakt definierten Zeit- und Temperaturschema, welches in einem PCR-Gerät für jeden Primer vorher programmiert wird:

Beispielablauf eines PCR-Programms:

1. Denaturierung: 95°C, 10 Minuten
2. Wiederkehrender Zyklus (Wiederholungen und Temperatur abhängig vom Primer)
  - 2.1 Denaturierung: 95°C, 15 Minuten
  - 2.2 Annealing: primerspezifische Temperatur für eine Minute
  - 2.3 Elongation: 72°C 1 Minute
3. Elongation: 72°C 10 Minuten

Pro verwendete Probe wurde folgender Ansatz in einem 96-Well vorgelegt:

10 µl	SYBR® Green
0,1 µl	Primer forward
0,1 µl	Primer reverse
7,8 µl	RNase freies H <sub>2</sub> O

Wenn cDNA gemessen werden sollte, wurde Wasser für eine Verdünnung von 1:5 hinzugefügt und pro Ansatz 2 µl cDNA in jedes 96-Well pipettiert. Um möglichst exakte Ergebnisse zu erhalten, erfolgte die Realtime-PCR-Messung in Dreifachbestimmung und mit Negativkontrolle ohne Nukleinsäuren.

4.2.11 Verwendete Primer für Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Name	Sequenz	Hersteller
RCAN1	For: 5' tggaaagactgacaaggcgt-3' Rev: 5'cagccctaagcaagagtgga-3'	Biomers (Ulm)
Wnt1	For: 5' gagaggaccaagacagccag-3' Rev: 5'-caccacagccagacagctta-3'	Biomers (Ulm)

Name	Sequenz	Hersteller
Mmp13	For: 5' gctgtcagggtgcaggacttt-3' Rev: 5' cctgaccaatcttcctccaa-3'	Biomers (Ulm)
Wnt10a	For: 5' tcttctactgctgctggct-3' Rev: 5'-ctgggccctgaattggtgtt-3'	Biomers (Ulm)
Rcan P4	For: 5'-cgcccttcctatagagcagac-3' Rev: 5'-accgttccacaggctaacac-3'	Biomers (Ulm)
Rcan P1	For: 5'-tccatatagcgtcccagagg-3' Rev: 5'-ggggagggtctagggagtttg-3'	Biomers (Ulm)
Mcl1 enhancer	For: 5'-ggggatccaaagctaccccatgtgaatcc-3' Rev: 5'-ggggatccagcttctaagtaactgggcttc-3'	Biomers (Ulm)
CyclinD3 P1	For: 5'-aacgttgtgacgtaggagca-3' Rev: 5'-agagcaagagtgcgggtag-3'	Biomers (Ulm)
Rcan P3	For: 5'-ccttagctccgctccactc-3' Rev: 5'-tctataggaagggcgggact-3'	Biomers (Ulm)
CyclinD3 500kb	For: 5'-agaggctcctgccattagt-3' Rev: 5'-aagtcccacttctgtcct-3'	Biomers (Ulm)
CyclinD3	For: 5'-cgagcctcctacttcagtg-3' Rev: 5'-agggcctgtctcaagctaca-3'	Biomers (Ulm)
RCAN1 enhancer 26kb	For: 5'-ggggatccgatggatatgggaagatgc-3' Rev: 5'-ggggatccatgttgataggggtttcca-3'	Biomers (Ulm)
RCAN1 enhancer 22kb	For: 5'-ggggatccgccatcttatctgtcatcgagt-3' Rev: 5'-ggggatccgctgcagtgatatttagcatgg-3'	Biomers (Ulm)

Tabelle 10 - Verwendete Primer für qRT-PCR

## 4.3 Zellbiologische Methoden

### 4.3.1 Verwendete Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Abstammung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Medium</b>
Panc1	Humane Pankreas-karzinomzellen	European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Großbritannien	DMEM + 10% FCS
NKC	Murine Pankreas-karzinomzellen Genotyp: c.a.NFATc1, LSL-KRAS <sup>G12D/+</sup> , pdxCre <sup>+/-</sup>	eigene Arbeitsgruppe	DMEM + 10% FCS + 1% Nicht-es-sentielle Aminosäuren (NEAA)
KNS	Murine Pankreas-karzinomzellen, Genotyp: STAT3 <sup>-/-</sup> , c.a.NFATc1, LSL-KRAS <sup>G12D/+</sup> , pdxCre <sup>+/-</sup>	eigene Arbeitsgruppe	DMEM + 10% FCS + 1% Nicht-es-sentielle Aminosäuren (NEAA)

Tabelle 11 - Verwendete Zelllinien

Die Zelllinien wurden in Inkubatoren bei 37°C sowie 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, in regelmäßigen Abständen erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle des Wachstums. Zum Zeitpunkt der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend durch Trypsin/EDTA vereinzelt. Je nach Versuch wurden die Zellen erneut ausgesät und weiterverwendet, in der Regel etwa 5-10 % der vorhandenen Population.

Zusammensetzung des verwendeten Mediums:

500 ml	DMEM
50 ml	FCS
1 ml	Penicillin/Streptomycin + NEAA

4.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Um Zelllinien langfristig zur Verarbeitung verfügbar zu haben, wurden Aliquots der Zellsuspensionen zur langfristigen Aufbewahrung in ein Kryogefäß mit 10% DMSO gegeben. Um eine langsame Herunterkühlung (1°C pro Minute) zu gewährleisten, wurden die Kryogefäße über Nacht bei -80°C in einem besonderen Kryocontainer (Mr. Frosty) gelagert. Nach der schrittweisen Herunterkühlung wurden die Kryogefäße zur weiteren Aufbewahrung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

4.3.3 Auftauen von Zellen

Die Stocks der Zelllinien wurden in Kryogefäßen und 10% DMSO in flüssigen Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad (37°C) langsam aufgetaut und anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Kultivierungsgefäß inkubiert. Um die DMSO-Rückstände aus der Zelllinie zu entfernen, wurde am nachfolgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.3.4 Zellzahlbestimmung

Um die genaue Zellzahl für bestimmte Versuche zu bestimmen, wurde ein Hämozytometer mit einer Einteilung nach Neubauer verwendet. Zur Vereinzelung der Zellen vor der Zählung erfolgte eine Kurzinkubation mit Trypsin/EDTA. Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium überführt. Aus dieser Zellsuspension wurde eine kleine Probe an den Oberrand eines Deckglases, welches vorher auf das Hämozytometer aufgelegt worden war, aufgetragen. Zur Erfassung der Zellzahl pro Milliliter wurden alle vier Eckquadranten ausgezählt, der Mittelwert gebildet und das Endergebnis mit dem Faktor 10000 multipliziert.

#### 4.3.5 Transfektion der Zelllinien

Um die oben aufgeführten DNA-Konstrukte in die verwendeten Zelllinien zu transfizieren, wurden die Zelllinien mit Transfast™ Reagenz (Promega) oder Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nach den jeweiligen Herstellerangaben behandelt. Ebenfalls wurden in die Zellsuspensionen zur Negativkontrolle „Small-interfering RNA“ (siRNA) gegeben und mit siLentFect™ Lipid Reagent (Biorad) nach Herstellerangaben transfiziert.

#### 4.3.6 Luciferase-Reportergenassay

Zur Luciferase-Reportergenassay wurden jeweils 4,5x10000 Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Nach ausreichendem Wachstum, in der Regel nach einem Tag, wurden 200ng der angegebenen Konstrukte (siehe Tab. 7) in einem Dreifachansatz in die Zellen transfiziert. Als Reportergen diente in diesem Versuchsansatz die Luciferase aus *Photinus pyralis* (Firefly). Um die Transfektionseffizienz zu normalisieren, wurden pro Well jeweils 15ng eines Renilla-Reporterkonstruktes kotransfiziert, welche die Luciferase der *Renilla reformis* exprimiert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Zellernte. Dafür wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von 100 µl des 1x passiven Lysepuffers (Promega) unter 10 minütigem Schütteln bei Raumtemperatur lysiert. Um die Luciferaseaktivität der einzelnen Konstrukte zu untersuchen, wurden aus dem „Dual-Luciferase®-Reporter Assay System“ (Promega) Substrate für beide Luciferaseenzyme dazugegeben und die Werte mit der Hilfe eines DLReady™ Luminometers (Berthold Technologies) ermittelt. Aus dem Quotienten Fireflywert/Renillawert sowie dem Mittelwert aus allen Ergebnissen der Dreifachbestimmung ergibt sich in der Folge die relative Aktivität der Luciferase inklusive Standardabweichung.

#### 4.3.7 DNase 1 Hypersensitivitäts-Assay

Der DNase 1 Hypersensitivitäts-Assay wurde nach dem Protokoll von Song et al. durchgeführt (Song & Crawford 2010). Kurzbeschreibung des Versuchs: Für die DNase 1 Hypersensitivitäts-Assay wurden die Zellen mit siRNA transfiziert und anschließend für 48 Stunden in Lysis Buffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation, um die Zellkerne zu isolieren. Die Zellkerne wurden anschließend in 1x DNase I Inkubationsbuffer (New England Biolabs) resuspendiert sowie nach Protokoll mit DNase 1 (New England Biolabs) versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion der DNase I durch die Hinzugabe von 50mM EDTA gestoppt. Die

DNA wurde anschließend durch die Phenol-Chloroformmethode extrahiert. Die extrahierte DNA wurde anschließend durch qRT-PCR weiter analysiert.

Name	Sequenz	Hersteller
RCAN1 Enhancer	5'-tggaaagactgacaaggcgt-3'	Biomers (Ulm)
Negativkontrolle	5' -ccgtctctccacgggttaaaa-3'	Biomers (Ulm)

Tabelle 12 – qRT-PCR Primer für DNase 1 Hypersensitivitäts-Assay

## 4.4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.4.1 Proteinisolation aus Zelllinien

Zur Gewinnung von Proteinmaterial aus Gesamtzelllysat wurden die Zellen zunächst einmal mit 1x PBS gewaschen. Je nach gewünschtem Versuche wurden 50µl/200µl eines selbst erstellten Lysepuffers pro 6-well/10cm-Schale hinzugegeben. Nach kurzer Inkubationszeit bei RT auf dem Schüttler wurden die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben gevortext, für 30 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend für 10 Minuten bei 14000 rpm in einer Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert zu werden. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden nach der Zentrifugation in ein neues Gefäß überführt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

### 4.4.2 Isolierung von Protein aus Geweben

Zur Isolierung von Proteinen aus Tumorgewebe wurde die Maus zunächst geopfert und das Pankreasgewebe mit einem sterilen Besteck herausgenommen und zerkleinert. Das gewonnene Pankreasgewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Anschließend wurde mit Hilfe eines Skalpells auf Trockeneis ein etwa Stecknadelkopf großes Stück abgeschnitten. Dieses Stück wurde in Lysepuffer gegeben und durch Stampfen



weiter zerkleinert. Zur weiteren Vereinzelung der Proteine wurde das Gewebestück durch Ultraschall weiter aufgeschlossen und für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der entstehende proteinhaltige Überstand wurde entweder bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt für Western-Blot-Analysen genutzt.

#### 4.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um vergleichbare Versuchsergebnisse zu erzielen, führten wir vor den Versuchen eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) durch. Hierzu wurde das vorgefertigte Bradford Reagenz 1:5 verdünnt und anschließend mit 2 µl der zu messenden Probe verdünnt. Als Vergleich diente eine Verdünnungsreihe von 1-8 µl eines BSA-Proteinstandards. Zur Ermittlung der Konzentration wurde die Absorptionzunahme bei 595 nm im Photometer gemessen und anschließend anhand der Eichgerade der Kontrollwerte mathematisch bestimmt.

#### 4.4.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird als Verfahren zur Auftrennung von Proteinen verwendet. Um die Proteine auftrennen zu können, wurden die Lysate vorher bei 95°C für fünf Minuten aufgekocht. Durch die Zugabe der reduzierenden Reagenz 2-Mercaptoethanol nahmen die zu analysierenden Proteine eine für die weitere Versuchsdurchführung essentielle monomere Struktur ein.

Zur Durchführung der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurden je nach untersuchter Proteingröße 10-/15%ige Polyacrylamidgele gegossen. Diese wurden nach der unten angegebenen Zusammensetzung erstellt. Dazu wurde zuerst die Stoppgellösung in einen Spalt gegossen, der durch das Befestigen von zwei Glasplatten mit Hilfe von Spacern entstanden ist. Nachdem diese Schicht hart geworden war, wurden die vorbereitete Trenngellösung sowie anschließend die Sammelgellösung aufgeschichtet. Um Taschen für die Proteinproben zu erstellen, wurde direkt nach Eingießen der Lösungen noch ein Kamm im Gel platziert. Anschließend wurden die Gele zur Festigung für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Je nachdem, wie hoch die Proteinkonzentration der Probe war, wurden ca. 10-20 µg Proteinproben mit 5x Lämmli-Puffer gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock

aufgekocht. Dadurch denaturierten die Proteine und nehmen eine monomere Struktur ein. Im Anschluss wurden die Proteinproben in die Taschen des Polyacrylamidgels gegeben. Zur späteren Zuordnung des Molekulargewichts ließ man einen Proteinmarker in einer der Taschen mitlaufen. Die Gele wurden dann in eine Gelektrophoresekammer gegeben und diese mit Laufpuffer gefüllt. Bei einer Spannung von 120 Volt wartete man, bis die Proben das Sammelgel passiert hatten, und erhöhte anschließend die Spannung auf 160 Volt. Je nach Molekulargewicht der verwendeten Proteine dauerte diese Prozedur 60 bis 120 Minuten.

#### 4.4.5 Western-Blot-Analyse

Nach der erfolgreichen Auftrennung der Proteine in der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-Page) wurden diese durch einen speziellen Transfer auf eine immobilisierte Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) übertragen.

Für die Visualisierung der Proteine wurde ein zweiteiliges Antikörperverfahren verwendet.

Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran geschah durch das Tank-Blot-Verfahren für 60-90 Minuten bei 300-400 mA und 4 °C. Hierzu wurde eine Transferkassette nach folgendem Schema vorbereitet:

#### **Kathode-Schwamm-Filter-Gel-Nitrocellulosemembran-Filter-Schwamm-Anode**

Nach dem Tank-Blot-Verfahren wurden die Membranen 60 Minuten mit Blockpuffer behandelt. Zur spezifischen Darstellung von bestimmten Proteinen wurden die Membranen danach über Nacht und bei 4 °C mit den jeweiligen primären Antikörpern inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen zunächst dreimal für 10 Minuten unter Schütteln mit TBS gewaschen, um danach mit einem gewebspezifischen Sekundärantikörper für weitere 60 Minuten inkubiert zu werden. Nach erneutem dreimaligen Waschen von jeweils 10 Minuten mit TBS konnten die Proteine mit Enhanced Chemiluminescence Reagenz (ECL-) Entwicklerlösung je nach untersuchtem Protein für 10-300 Sekunden inkubiert, um anschließend mit einer Kamera detektiert und mit der Software ImageQuant 5.1 dokumentiert und ausgewertet zu werden.

Name	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
STAT3	Maus	Cellsignaling	1:1000
pSTAT3	Kaninchen	Cellsignaling	1:1000
Wnt1	Kaninchen	Abcam	1:1000
Wnt10a	Kaninchen	Novus Biologicals	1:1000
Ck19	Maus	Santa Cruz	1:500
HA	Maus	CellSignaling	1:1000
P53	Maus	CellSignaling	1:1000
RCAN1	Kaninchen	Lifespan Biosciences	1:500
Mdm2	Kaninchen	Abcam	1:1000
β-Aktin	Maus	Sigma	1:20000

Tabelle 13 - Primärantikörper für Western Blot Analyse

Name	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus	Pferd	Cell-Signalling	1:10000
Anti-Kaninchen	Ziege	Cell-Signalling	1:10000

Tabelle 14 - Sekundärantikörper für Western Blot Analyse

## 4.5 ChIP (Chromatinimmunopräzipitation)

Zur Untersuchung ausgewählter Protein-DNA Interaktionen im Bereich der Promotor- und Enhancerregionen von bestimmten Zielgenen führten wir verschiedene ChIP-Analysen durch. Das Versuchsprotokoll für die ChIP-Analyse stammt von Caroline Bouchard und wurde von Till Körtum und unserer Arbeitsgruppe selbst weiter modifiziert. Der Versuch streckt sich über vier Tage und wurde mit primären Tumorzelllinien von Mäusen aus eigener Zucht durchgeführt.

### 4.5.1 Versuchstag 1

#### Chromatinisolation

Die gewünschte Zelllinie wurde in 10 oder 15 cm Petrischalen angezüchtet und bis zu einer Dichte von etwa 70 % bei 37 °C inkubiert. Je nach Versuchsansatz wurden die Zelllinien dann entweder in Reinform verwendet oder beispielsweise noch mit siRNA transfiziert. Anschließend wurde Formaldehyd zu einer finalen Konzentration von 1% zu den Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dieser Schritt wurde unter dem Abzug durchgeführt. Um die Vernetzung von DNA und Proteinen zu stoppen, wurde 2,5M Glycin bis zu einer finalen Konzentration von 125 mM zu den Zellen gegeben. Dieses Gemisch wurde ebenfalls für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand entfernt, die Zellen zweimal mit vorgekühltem PBS (4°C) gewaschen und mit einem Scraper in 15 cm Falcons gesammelt und auf Eis gelegt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets in den Falcons in flüssigem Stickstoff schockgefroren. An dieser Stelle wurden die Pellets entweder bei -80°C für zukünftige Versuche gelagert, oder die ChIP-Analyse wurde direkt fortgesetzt. Dafür wurden die schockgefrorenen Pellets in 15ml Falcons auf Eis aufgetaut und in Lysepuffer 1 (3 ml für bis zu zehn 15 cm Zelldishes) zusammen mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Anschließend inkubierte das Gemisch für 15 Minuten auf Eis, um danach erneut für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde entfernt und danach Lyse Buffer 2 dazugegeben. Wir verwendeten 1 ml Lyse Buffer 2 pro eingesetzter 15 cm Petrischale. Das Gemisch inkubierte im Folgenden erneut für 10 Minuten auf Eis. Nach diesem Schritt wurde das Gemisch aliquotiert. Wir nutzen hierzu 1 ml der Lösung in einem 15 ml Falcon. Für die

Sonifizierung verwendeten wir den Branson Sonifier mit einer Mikrospritze, einer Amplitude von 20% und 120 Impulse von einer Sekunde mit zwei Sekunden Pause zwischen den einzelnen Impulsen. Während des Sonifizierens wurde die Probe in einem großen Becherglas, welches randvoll mit Eis und Ethanol war, gekühlt. Die Spitze des Sonifiziergeräts führten wir bis etwa 70% der maximalen Tiefe zentral in das Falcon ein. Dadurch wurde versucht, Schaumbildung beim Sonifizieren zu vermeiden. Falls es doch zu Schaumbildung kam, wurden die Proben für 10 Minuten auf Eis stehen gelassen, bis der Schaum sich zurückgebildet hatte, um danach erneut sonifiziert zu werden. Anschließend wurden die Proben bei 15000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert um danach den Überstand der Aliquots je nach Versuchsansatz wieder zusammenzuführen. Von jeder Probe die untersucht werden sollte wurden danach 50 µl für eine Revision entnommen und mit 20 µg Proteinase K sowie 20 µg RNase A vermischt und gevortext. Diese Gemische wurden dann für drei Stunden bei 55°C inkubiert, anschließend bei 65°C über Nacht.

#### Blockieren der Protein Sepharose-beads

Gleichzeitig wurde am ersten Tag die Sepharose beads geblockt. Dazu bereiteten wir 75 µl eines 50% Gemisches von Beads mit RIPA Buffer pro Probe und IP vor, die untersucht werden sollte. Die Beads wurden zweimal mit RIPA Buffer gewaschen und anschließend in 10 ml RIPA Buffer resuspendiert. Ebenso gaben wir 1 mg/ml BSA, 400 µg/ml, sonifizierte Lachssperma DNA sowie Proteaseinhibitoren (400 µl Complete 25x) hinzu und inkubierten das Gemisch unter Rotation bei 4°C über Nacht.

#### 4.5.2 Versuchstag 2

##### Überprüfung der Chromatinqualität

Um die Effizienz des Sonifizierungsvorgangs zu überprüfen, gossen wir ein 1% Agarose Gel mit Ethidiumbromid. Pro Probe entnahmen wir etwa 10 µl der über Nacht bei 65°C inkubierten Probe und vermischten diese mit 5 µl Loading Buffer und luden das Gemisch ins Gel zusammen mit einem entsprechenden Marker. Das Gel wurde bei 80 Volt laufen gelassen, bis die ersten Proben etwa 70% der Gelfläche zurückgelegt hatten. Unter UV-Licht wurde das Gel ausgewertet, eine Chromatingröße zwischen 1000-500 bp wurde

angestrebt, fielen die Fragmente größer aus, wurde erneut sonifiziert, bis das Ergebnis zufriedenstellend war.

Ebenso wurden die Proben wie an Tag 4 dieses Protokolls aufgereinigt und anschließend mit dem Nanodropgerät eine Messung der DNA-Konzentration in den Proben durchgeführt, um für die sich anschließende IP gleiche DNA-Ausgangsmengen einzusetzen.

#### Preclearing

Die Lysate, die über Nacht im Kühlschrank gelagert wurden, werden in Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei 13000 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die DNA-Pellets sollten als schwarze glasige Pellets sichtbar sein. Anschließend werden die Proben wieder in 15 ml Falcons gepoolt.

Von den über Nacht geblockten Beads wird eine 50%-Lösung angefertigt, der Überstand wird aufgehoben. Pro Probe werden 25 µl der 50%-Lösung hinzugefügt. Der verbleibende Überstand wird zurück zu den Beads gegeben und bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt.

#### Immunopräzipitation (IP)

Das zu untersuchende Chromatin wird in Eppendorffgefäße verteilt. Pro Probe werden 300 µl oder 600 µl Chromatin verwendet, je nachdem, wie hoch die gemessene Konzentration im Nanodrop war und wie viel Probe zur Verfügung steht. Als Input Signal wurde 1% von jedem Aliquotvolumen zur Seite gestellt. Zu den anderen Aliquots werden die entsprechenden Antikörper hinzugegeben (Tab. 15). Ebenso wird ein Aliquot mit einer spezifischen Kontrolle (unspezifische IgG-Antikörper) angefertigt. Die Gemische werden bei 4 °C über Nacht rotiert.

### 4.5.3 Versuchstag 3

#### Waschen der Immunopräzipitationsproben

Die vom Vortrag übrig gebliebenen Beads werden abgesaugt und anschließend zu einer 50%-Lösung mit RIPA verdünnt. Anschließend werden 50 µl zu jeder der über Nacht inkubierten Proben hinzugefügt und für weitere zwei Stunden bei 4°C rotiert. Die Proben werden bei 5000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit einer sehr dünnen Nadel abgesaugt. Hierzu bauten wir uns aus einer 1ml-Pipettenspitze und Parafilm eine geeignete Absaugeinrichtung, um die Beads nicht versehentlich mit abzusaugen. Die Proben werden dann wieder auf Eis gelegt und nacheinander je einmal mit Waschpuffer 1, Waschpuffer 2, zweimal mit Waschpuffer 3 und abschließend noch zweimal mit TE-Puffer gewaschen. Die Puffer wurden auf Eis vorbereitet und die Proben auch die komplette Zeit auf Eis gehalten. Für den Waschvorgang wurde jede Probe mit jeweils 1 ml der jeweiligen Lösung verdünnt, kurz mit der Hand geschüttelt und anschließend bei 13000 rpm für eine Minute bei 4°C inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift mit TE-Puffer wird der flüssige Überstand komplett entfernt. Dazu wird die Absaugnadel einmal kurz komplett in die Beads hineingesteckt.

#### Elution und Reversion

Für die Elution wurde ein spezieller Elutionspuffer verwendet, der bei jedem Versuch neu angesetzt wurde. Vom Elutionspuffer werden 250 µl zu jeder Probe hinzugegeben und die Proben anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur rotiert, anschließend erneut bei 13000 rpm für eine Minute inkubiert. Anschließend konnten die Proben auf Raumtemperatur weiter gelagert werden. Für die Reversion wird ebenfalls ein Reversionspuffer immer frisch angesetzt. Der Reversionspuffer wird den Proben hinzugefügt und die Proben anschließend für 3 Stunden bei 55°C inkubiert, anschließend bei 65°C über Nacht.

#### 4.5.4 Versuchstag 4

##### Purification

Die Proben wurden in 15ml Falcons überführt und je Probe 2,75 ml PB Puffer aus dem Qiagen Kit hinzugefügt. Anschließend werden je 600 µl der Proben auf die Reinigungssäulen aus dem gleichen Kit aufgetragen und anschließend bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde danach entfernt und so lange weiter aufgereinigt, bis die gesamte Probe aus dem Falcons durch die Reinigungssäule gelaufen ist. Dazu wird nach jedem erneuten Auftragen auch wieder bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Zuletzt wurden die Reinigungssäulen mit PE Puffer aus dem Qiagen Kit gewaschen, um den restlichen Puffer zu entfernen. Vor der finalen Elution werden die Säulen in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend mit 30 µl EB buffer aus dem Qiagen Kit gewaschen, drei Minuten gewartet und anschließend kurz zentrifugiert. Zur Analyse der Proben führten wir anschließend qRT-PCR-Analysen durch.

##### Verwendete Antikörper

Name	Herkunft	Konzentration	Hersteller
IgG	Maus	1 µg/IP	Milipore
IgG	Kaninchen	1 µg/IP	Milipore
H3K4	Kaninchen	4 µg/IP	Abcam
H3K27-ac	Kaninchen	4 µg/IP	Abcam
P300	Kaninchen	4 µg/IP	Santa Cruz
STAT3	Kaninchen	4 µg/IP	Cell Signaling
	Maus	4 µg/IP	Santa Cruz
NFATc1	Maus	4 µg/IP	Abcam
Brg1	Kaninchen	4 µg/IP	Abcam
Poly2	Maus	4 µg/IP	Milipore

Tabelle 15 - Antikörper ChIP



## 4.6 Histologie

Zur histologischen Aufarbeitung der Mauspankreatata wurden verschiedene Färbungen durchgeführt. Vorher wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Pankreatata zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Anschließend wurden die entnommenen Gewebeproben zuerst für einige Minuten in PBS gewaschen und anschließend über Nacht in Formalin gehalten. Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebeproben für jeweils 2 Stunden zur Entwässerung nacheinander in Gefäße mit 70%, 80%, 96% und 100% Ethanol gegeben. Danach wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank in Methylbenzoat inkubiert. Zuletzt wurden die Proben für 15 Minuten in Xylol gegeben, um danach in kleine Gefäße mit flüssigen, erhitztem Paraffin platziert zu werden. Hier wurde das Paraffin mehrfach abgegossen und neu hereingelassen, bis der Xylolgeruch vollständig verschwunden war. Mithilfe der Einbettmaschine wurden die Gewebeproben anschließend in Einbettringe zu Blöcken gegossen.

Nach ausreichender Auskühlung konnten histologische Schnitte zur weiteren Analyse angefertigt werden. In der Regel wurden mindestens zehn repräsentative 4 µm dicke Serienschnitte pro Pankreas angefertigt, bei größeren Tumorentwicklungen auch von mehreren Pankreaslokalisationen. Standardmäßig wurde von jedem Schnitt eine H & E Färbung angefertigt.

## 4.7 Histologische Färbungen

### 4.7.1 H & E Färbung

Die Objektträger mit dem paraffinierten Pankreasgewebe wurden für jeweils fünf Minuten zweimal hintereinander in Roticlear entparaffiniert und dadurch rehydriert. Anschließend wurde der Gewebeschnitt in einer absteigenden Alkoholreihe mit 99%, 85%, 70% und 50% Ethanol für jeweils zwei Minuten dehydriert, um danach für zwei mal zwei Minuten in destilliertes Wasser gestellt zu werden. Danach wurden die Objektträger mit Hämalaun nach Mayer für 3 Minuten gefärbt und direkt anschließend in lauwarmen, fließenden Wasser entfärbt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Wasser nicht direkt auf die Objektträger fließt, um eine Ablösung des Gewebes zu verhindern. Danach wurden die

Objektträger für etwa 30 Sekunden in 0,5%-iger Eosin-Lösung gegengefärbt und anschließend kurz in destilliertem Wasser gegengeschpült, um übermäßigen Farbstoff abzuwaschen. Anschließend wurden die frisch gefärbten Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dafür wurden sie nacheinander für 2 Minuten in 50%, 70%, 85% und 99% Ethanol gehalten. Zum Schluss wurden die Objektträger für zweimal fünf Minuten in Roticlear gestellt, um danach eingedeckelt zu werden.

#### 4.7.2 Stromafärbung (Kollagen 1 & 3)

Für die durchgeführten Stromafärbungen verwendeten wir das Picrosirius Red Stain Kit, welches Kollagen Typ 1 und Typ 3 färbt. Das Kit enthält drei verschiedene Flüssigkeiten, die als Solution A, Solution B und Solution C bezeichnet werden. Zu Beginn der Färbung wurden die Objektträger wie bei der H&E-Färbung zunächst entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (99%, 96%, 80%, 70%, 50%) für jeweils drei Minuten hydriert. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten in Solution A gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Objektträger für 60 Minuten in Lösung B gegeben und direkt danach für zwei Minuten in Lösung C. Zum Schluss werden die Objektträger für 45 Sekunden in 70% Ethanol gegeben, anschließend wie bei der H&E Färbung dehydriert, mit Roticlear behandelt und eingedeckelt.

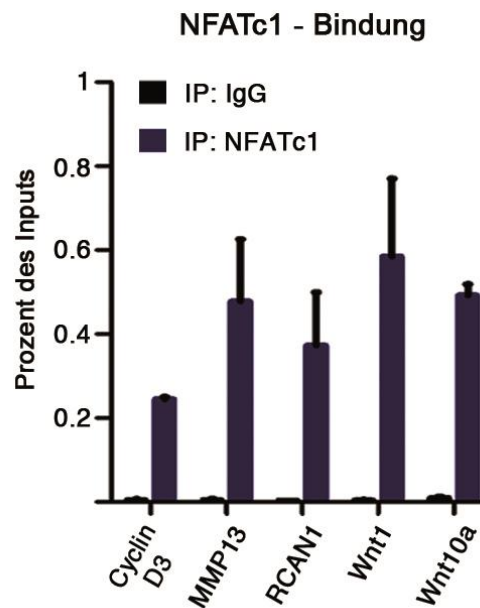
### 4.8 Statistische Auswertung

Standardabweichungen (SD) sowie Mittelwerte (MW) wurde für alle numerischen Ergebnisse berechnet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 NFATc1 bindet distal von Promotoren ausgewählter Zielgene und reguliert darüber deren Transkription

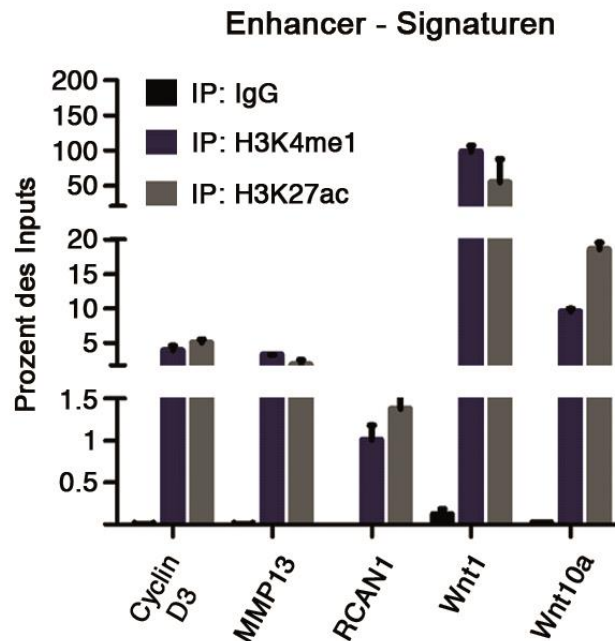
Zur Identifizierung der genomweiten NFATc1-DNA-Bindung wurde in NKC-Zellen eine ChIP-Seq Analyse durchgeführt, die eine Anzahl von 1798 NFATc1 Bindungspeaks ergab (Baumgart et al. 2014). Um genauer zu analysieren, welche funktionelle Relevanz diese Bindungsstellen besitzen und welche Transkriptionsvorgänge dadurch im Pankreaskarzinom reguliert werden, wurde das Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) benutzt (McLean et al. 2010). Mit Hilfe dieses Tools konnte untersucht werden, ob NFATc1 an Stellen im Genom bindet, die mit der Entstehung und Progressionen von Neoplasien vergesellschaftet sind (Baumgart et al. 2014). Durch diese Analysen konnte gezeigt werden, dass neben Cyclin D3 (ccnd3), RCAN1 (Regulator of Calcineurin 1), Wnt1 und Wnt10a auch die Matrix-Metalloproteinase 13 (mmp13) ein direktes Zielgen von NFATc1 darstellt und NFATc1-abhängig exprimiert wird (Baumgart et al. 2014). Um die NFATc1-Peaks im Bereich der genannten Gene zu validieren, wurden zunächst individuelle ChIP-Experimente vorgenommen (Abb.15), in denen eine NFATc1-Bindung an den beschriebenen Zielgenen verifiziert werden konnte.



**Abbildung 15: NFATc1 bindet an Enhancerregionen ausgewählter Zielgene.** ChIP-Analyse; NKC-Zellen; Zur Validierung der Daten der ChIP-seq wurden einzelne ChIP-Experimente durchgeführt, die die NFATc1-Bindung in der Nähe ausgewählter Zielgene bestätigten.

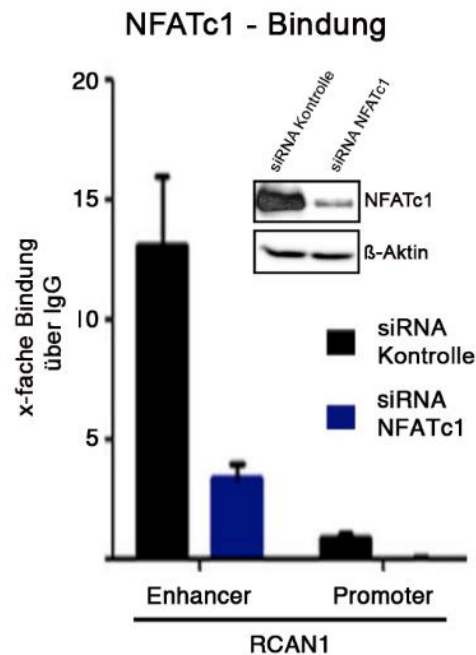
## 5.2 NFATc1-Bindungsstellen an ausgewählten Zielregionen weisen Enhancer-typische Modifikationen auf

Eine zentrale Beobachtung aus unserer NFATc1-ChIP-Seq war, dass NFATc1 vor allem distal des Transkriptionsstarts bindet (Baumgart et al., 2014). Vergleichende Analysen mit Datenbanken von Histon-ChIP-Seq-Untersuchungen zeigten eine signifikante Überlagerung von NFATc1-Peaks mit bekannten Enhancer-typischen Histonmodifikationen (Baumgart et al., 2014). Um diesen Befund in unserem Zellsystem zu verifizieren, wurde in individuellen ChIP-Experimenten untersucht, ob die NFATc1-gebundenen DNA-Bereiche der zuvor benannten NFATc1-Zielgene Enhancer-typische Histonmodifikationen wie H3K4me1 oder H3K27ac aufweisen. Wie in Abbildung 16 sichtbar ist, wurden die potentiellen Enhancersignaturen von fünf Genen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die vormals untersuchten Regionen, die eine erhöhte NFATc1-Bindung anzeigten (Abb. 16), ebenso auch eine erhöhte Dichte an Enhancer-spezifischen Elementen, H3K4me1 sowie H3K27ac, aufweisen (Abb. 16). Die Primer für diese Versuche wurden so designt, dass sie die potentiellen Enhancerregionen flankieren (Tab. 10).



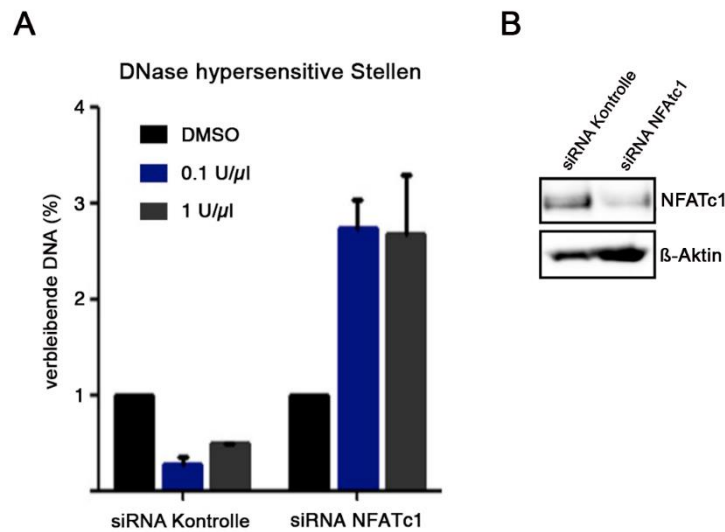
**Abbildung 16: Die Bindungsstellen von NFATc1 weisen Modifikationen auf, die typisch für Enhancerregionen sind.** ChIP-Analyse; NKC-Zellen; NFATc1-Bindungsstellen ausgewählter Zielgene zeigen eine erhöhte Bindung von H3K4me1 sowie H3K27ac.

Zur weiteren Verifizierung der gewonnenen Daten wurde des Weiteren RCAN1 ausgewählt. Es wurde anschließend in einem weiteren Experiment nicht nur erneut bestätigt, dass NFATc1 in der Enhancerregion von RCAN1 bindet, sondern auch gezeigt, dass NFATc1 in nur sehr geringem Maße an der Promotorregion von RCAN1 nachzuweisen ist (Abb. 17). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach NFATc1-Knockdown die Bindung von NFATc1 signifikant abnimmt, was die Spezifität der NFATc1-Bindung an RCAN1 unterstreicht.



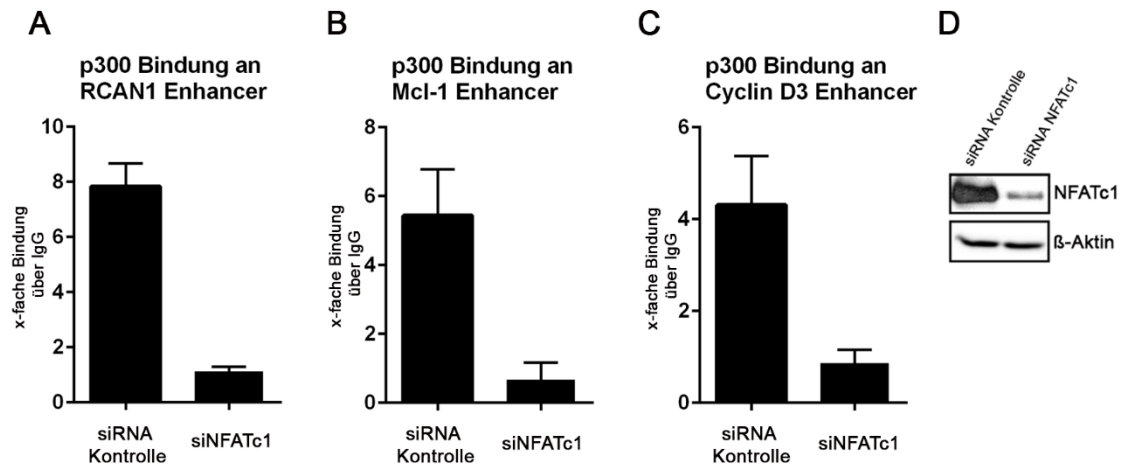
**Abbildung 17: NFATc1 bindet primär am Enhancer von RCAN1.** ChIP-Analyse, NKC +/- siRNA NFATc1. Nach NFATc1-Knockdown nimmt die Bindung von NFATc1 an Enhancer- und Promotorregion ab.

Als Voraussetzung für eine transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen muss das Chromatin in einer euchromatinen Konformation vorliegen, die die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie (RNA-Pol II etc.) an die DNA erlaubt. Die Chromatinkonformation lässt sich experimentell mithilfe des „DNase I Hypersensitivity Assays“ untersuchen (Song & Crawford 2010). Das Enzym DNase I kann euchromatine DNA-Abschnitte spalten, was wiederum statistisch ausgewertet werden kann. Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigt die Zelllinie mit transientem NFATc1-Knockdown eine deutlich erhöhte Rest-DNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust von NFATc1 die Öffnung der Chromatinstruktur behindert, sodass durch DNase I weniger DNA gespalten werden kann, was sich experimentell nachweisen ließ.

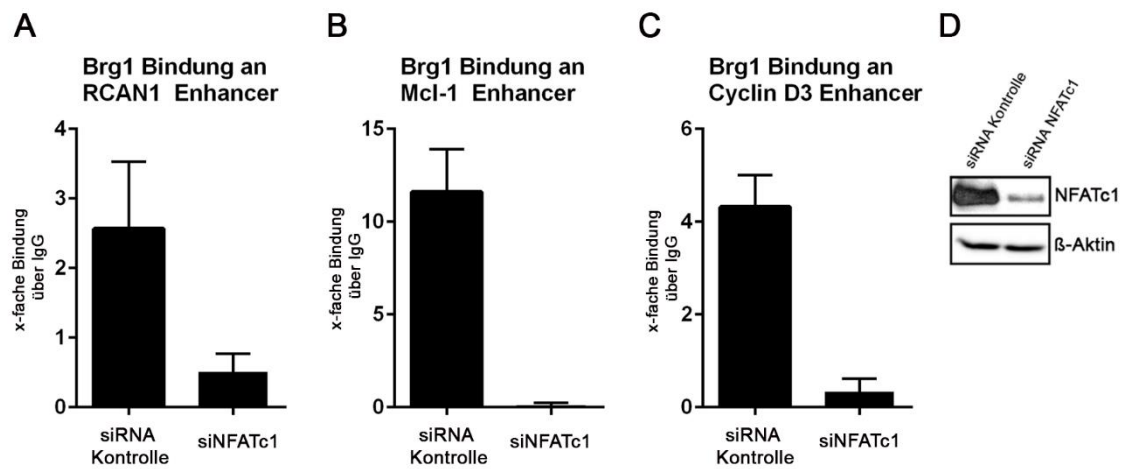


**Abbildung 18: NFATc1-Knockdown führt zu weniger offenen Chromatininstellen, die von der DNase I gespalten werden können.** Zellkerne aus NKC-Zellen; +/- siRNA NFATc1; nach Zugabe von DMSO bzw. verschiedenen Mengen von DNase I wurde durch qRT-PCR auf verbleibende RCAN1-Enhancerregionen getestet. (B) Knockdownkontrolle der verwendeten Zelllinien.

Weiterhin wurde gezeigt, dass p300, eine Histonacetyltransferase, die durch Acetylierung von Histonen mit einer euchromatinen Konformation assoziiert ist, in NKC-Zellen NFATc1-abhängig an ihre Zielpromotoren rekrutiert wird. Im Einklang damit reduziert sich auch die Bindung von Brg1, einem Protein, welches an azetylierte Histone bindet, nach genetischem Verlust von NFATc1. Folglich konnte gezeigt werden, dass sowohl p300 als auch Brg1 NFATc1-abhängig rekrutiert werden und dadurch eine offene Chromatinstruktur geschaffen wird, was eine elementare Voraussetzung für mögliche transkriptionelle Aktivität darstellt (Abb. 19 & Abb. 20).



**Abbildung 19: Ausgewählte Enhancerregionen werden durch NFATc1 geöffnet und rekrutieren p300.** ChIP-Analyse. Die p300-Rekrutierung an RCAN1-Enhancerregion (A), Mcl-1-Enhancerregion (B) sowie Cyclin D3-Enhancerregion (C) nimmt nach NFATc1-Knockdown deutlich ab. (D) Knockdownkontrolle der verwendeten Zelllinien.

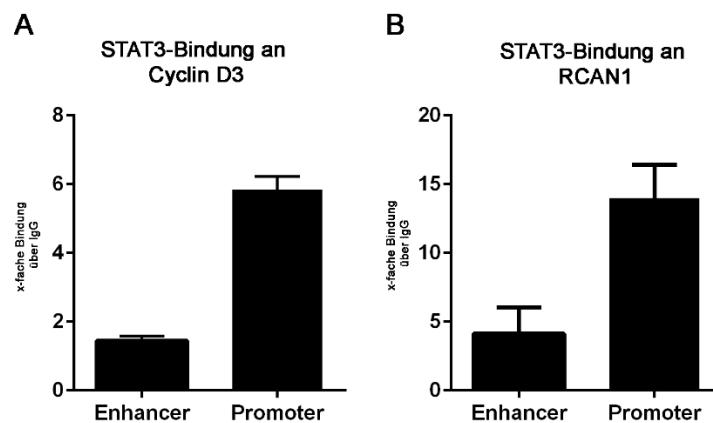


**Abbildung 20: Ausgewählte Enhancerregionen werden durch NFATc1 geöffnet und rekrutieren p300.** ChIP-Analyse. Die Brg1-Rekrutierung an RCAN1-Enhancerregion (A), Mcl-1-Enhancerregion (B) sowie Cyclin D3-Enhancerregion (C) nimmt nach NFATc1-Knockdown deutlich ab. (D) Knockdownkontrolle der verwendeten Zelllinien.



### 5.3 STAT3 bindet primär an Promotoren ausgewählter Zielgene

Da STAT3 bereits in Voruntersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe als Interaktionspartner von NFATc1 identifiziert wurde und gezeigt werden konnte, dass NFATc1 primär an Enhancerregionen von ausgewählten Zielgenen bindet, wurde der weitere Fokus auf die Bindungsmodalitäten des Partners STAT3 sowie mögliche Interaktionswege zwischen NFATc1 und STAT3 am Genom gelegt. An den dafür ausgewählten Zielgenen RCAN1 sowie Cyclin D3 konnte mithilfe von ChIP-Untersuchungen gezeigt werden, dass STAT3 primär am Promotor des Zielgens bindet (Abb. 21).



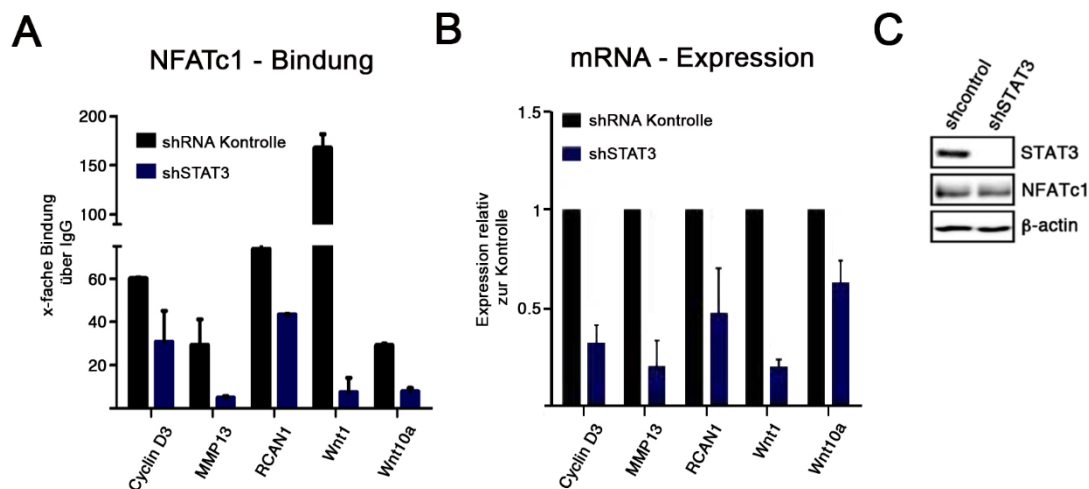
**Abbildung 21: STAT3 bindet primär an Promotoren von ausgewählten Zielgenen.** ChIP-Analyse durchgeführt mit NKC-Zellen. **(A)** STAT3 bindet primär an der Promotorregion von Cyclin D3. **(B)** STAT3 bindet primär an der Promotorregion von RCAN1. ChIP-Analyse, NKC-Zellen

### 5.4 STAT3 reguliert die NFATc1-Bindung an ausgewählten Enhancerregionen und reguliert die Genexpression gemeinsamer Zielgene

Da die Vordaten eine häufige Koexpression von NFATc1 und STAT3 zeigten, sollte genauer untersucht werden, inwiefern NFATc1 und STAT3 auch am Genom interagieren. Bisher konnte gezeigt werden, dass NFATc1 primär an Enhancerregionen von ausgewählten Zielgenen bindet, während STAT3 primär an Promotorregionen derselben Zielgene nachzuweisen ist. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Bindung von NFATc1 an diesen Enhancersignaturen von der STAT3-Aktivität abhängig ist. Für diese

Experimente wurden NKC-Zellen verwendet, die zuvor stabil mit gegen STAT3 gerichteter shRNA transduziert worden waren. Die Knockdownkontrolle (Abb. 22C) zeigt neben einem suffizienten Knockdown auch, dass die Menge an NFATc1 durch den Knockdownprozess nicht beeinflusst wurde.

Um die STAT3-abhängige NFATc1-Bindung an ausgewählten Enhancersignaturen zu analysieren, wurde zuerst ein ChIP-Experiment durchgeführt, um anschließend die Ergebnisse durch qRT-PCR quantitativ zu bestimmen (Abb. 22a). Um die NFATc1-Bindung in der Anwesenheit und Abwesenheit von STAT3 mit der transkriptionellen Aktivität der Zielgene zu korrelieren, wurden im selben Versuchsansatz die Expressionen von Cyclin D3, MMP13, Wnt1, RCAN1 und Wnt10a auf mRNA-Ebene bestimmt (Abb. 22b). Diese Daten zeigen, dass NFATc1 nicht nur STAT3-abhängig an den ausgewählten Zielregionen bindet, sondern der Verlust von STAT3 auch die transkriptionelle Aktivität dieser Gene beeinflusst.

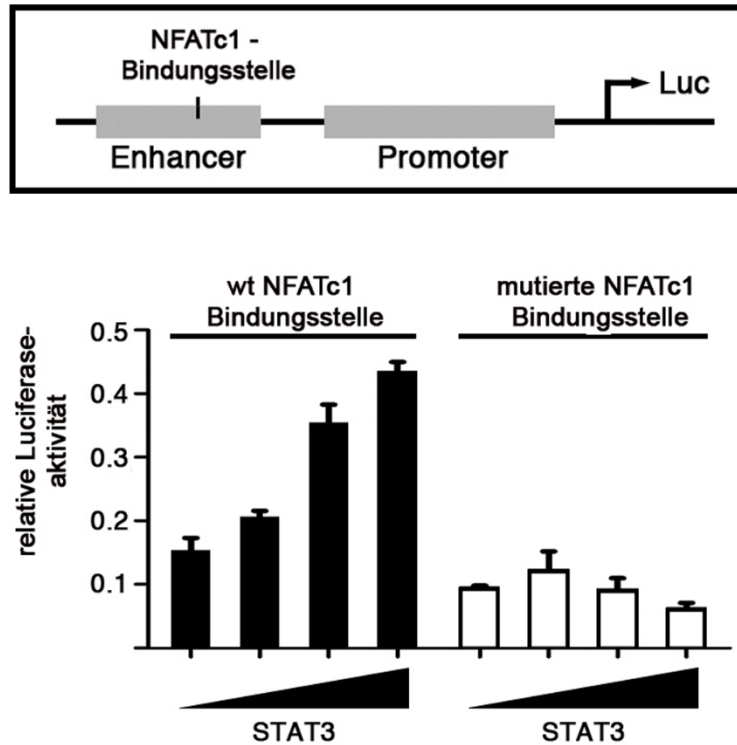


**Abbildung 22: STAT3 reguliert die NFATc1-Bindung an ausgewählten Enhancerregionen und reguliert die Genexpression ausgewählter Zielgene. (A)** ChIP-Analyse, NKC +/- shSTAT3; NFATc1 zeigt eine STAT3-abhängige Bindungsaffinität an den ausgewählten Enhancerregionen. **(B)** qRT-PCR, NKC +/- shSTAT3. Die mRNA-Expression ausgewählter Zielgene ist nach STAT3-Knockdown deutlich verringert. Alle Resultate wurden auf die Kontrollen normalisiert **(C)** Knockdownkontrolle der stabilen Transfektion. Die Knockdownkontrolle zeigt weiterhin, dass nach der Transfektion mit shSTAT3 die Menge an NFATc1 identisch ist mit der shRNA Kontrolle.

NFATc1 bindet seine Zielgene an seiner Konsensussequenz GGAAA (Baumgart et al., 2012). Neben dem Einfluss von STAT3 wurde auch die Bedeutung der NFATc1-Konsensussequenz für die NFATc1-Bindung sowie die daraus resultierende transkriptionelle Aktivität am Beispiel von RCAN1 untersucht. Dazu wurde die in der Literatur beschriebene NFATc1-Bindungsstelle (GGAAA) so verändert (GGCCC), dass NFATc1 nicht mehr daran binden kann (Graef et al. 2001). Um die STAT3-Abhängigkeit der RCAN1-Transaktivierung zu untersuchen, wurde eine aufsteigende Menge von STAT3 transfiziert, um anschließend die RCAN1 Luciferaseaktivität zu bestimmen. Der Versuch zeigte, dass die Bindung von NFATc1 an die normale NFATc1-Konsensussequenz mit steigender STAT3-Konzentration zunimmt.

Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Transfektion des RCAN-Konstrukts mit mutierter NFATc1-Bindungsstelle keine STAT3-abhängige Zunahme der Luciferaseaktivität und damit auch keine Zunahme der Transkriptionsaktivität, was suggeriert, dass die NFATc1-Bindung an der Enhancerregion eine entscheidende Rolle für die transkriptionelle Aktivierung von RCAN1 spielt (Abb. 23).

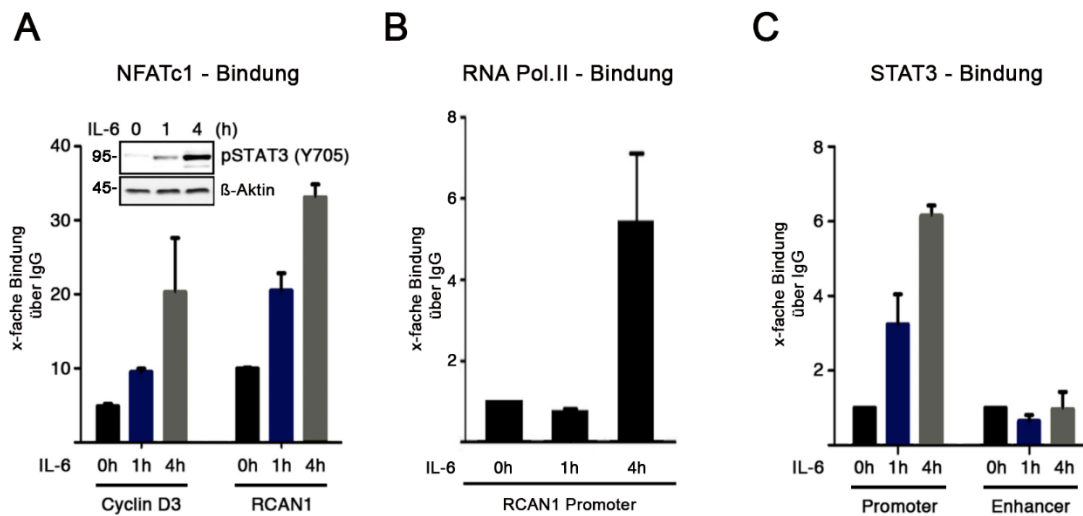
### RCAN1 Reporterkonstrukt



**Abbildung 23: STAT3 reguliert im Zusammenspiel mit NFATc1 die Transkriptionsaktivität des RCAN1-Gens.** Luciferase-Assay in NKC-Zellen. Schematische Darstellung des RCAN1-Reporterkonstrukts im schwarzen Kasten zeigt die NFATc1-Bindungsstelle (GGAAA), die in diesem Versuch verändert wurde (GGCCC), um die NFATc1-Bindung an dieser Stelle zu verhindern. Die NKC-Zellen wurden mit aufsteigender Menge STAT3 transfiziert (200ng, 300ng, 400ng, 500ng) sowie gleichzeitig mit einem RCAN1-Reporterkonstrukt, welches entweder eine normale NFATc1-Bindungsstelle oder eine mutierte NFATc1-Bindungsstelle hatte, transfiziert. Anschließend wurde die Transkriptionsaktivität durch die Aktivität der Luciferase im Absorptionsspektrometer bestimmt und ausgewertet.

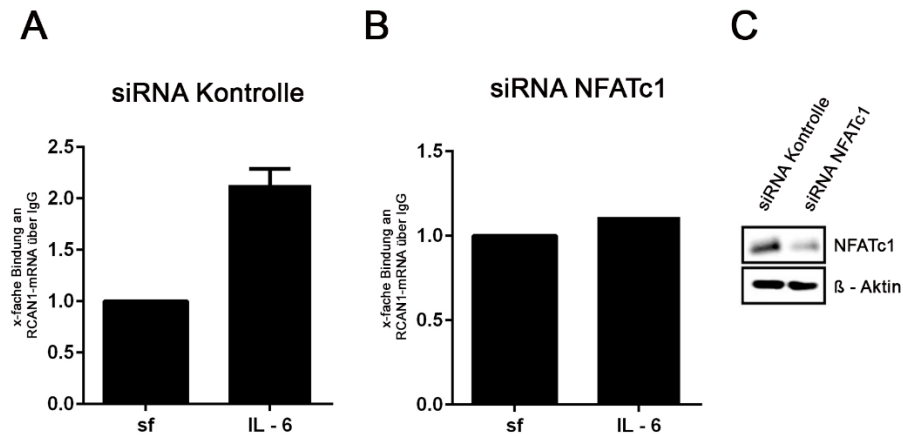
### 5.5 Interleukin-6 reguliert sowohl die Bindung von NFATc1 an Enhancersignaturen als auch die Bindung von STAT3 am Promotor und induziert dadurch die Transkription ausgewählter Zielgene

Interleukin-6 ist einer der wichtigsten Regulatoren des JAK-STAT3-Signalweges (Wang et al. 2011; Siveen et al. 2014; Grivennikov & Karin 2010). Daher liegt es nahe, nicht nur den direkten Einfluss von STAT3 auf die Bindungsaktivitäten von NFATc1 zu untersuchen, sondern auch zusätzlich die Rolle von Interleukin 6 zu evaluieren. Western-Blot Untersuchungen bestätigten eine Zunahme der STAT3-Phosphorylierung durch IL-6 (Abb. 24A). CHIP-Untersuchungen in NKC-Zellen nach IL-6-Titrations zeigten eine zeitabhängige Rekrutierung von NFATc1 an ausgewählte Enhancerregionen, deren transkriptionelle Aktivität durch Bindung von RNA-Pol II angezeigt wird (Abb. 24A & Abb. 24B). Weitere DNA-Bindungsanalysen zeigten eine IL-6-abhängige Rekrutierung von STAT3 am RCAN1-Promotor. Dabei ist die Bindungsaktivität von STAT3 am Promotor deutlich von der hinzugegebenen Konzentration von Interleukin-6 abhängig, während die Bindungsaktivität von STAT3 am Enhancer auch bei steigender Interleukin-6-Titration sich nicht signifikant gegenüber dem geringen Ausgangsniveau verändert (Abb. 24C). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die NFATc1-Bindung an ausgewählten Enhancerregionen nicht nur direkt von STAT3 abhängig ist, sondern sich auch durch die Zugabe von Interleukin-6 und damit die Aktivierung des Jak-STAT3 Signalwegs positiv beeinflussen lässt.



**Abbildung 24: Interleukin-6 reguliert die Bindung von NFATc1 an Enhancersequenzen und STAT3 an Promotorsequenzen.** (A) ChIP-Analyse, NKC-Zellen, NFATc1-Bindung an Cyclin D3 und RCAN1-Enhancersequenz in Abhängigkeit von Interleukin 6 (IL-6). Western-Blot zeigt eine zunehmende Phosphorylierung von STAT3 (dargestellt durch pSTAT3 (Y705)) in Abhängigkeit von IL-6 (B) ChIP-Analyse, NKC-Zellen, RNA-Polymerase II-Bindung an RCAN1- Promotorsequenz in Abhängigkeit von IL-6. (C) ChIP-Analyse, NKC-Zellen, STAT3-Bindung an RCAN1-Promotor- und Enhancersequenz in Abhängigkeit von IL-6. Es wurde für alle Versuche eine Menge von 50 ng IL-6 verwendet.

Um weiterhin zu zeigen, dass die Hinzugabe von Interleukin-6 nicht nur die Bindung von NFATc1 und STAT3 an bestimmte Zielregionen beschleunigt, sondern gleichzeitig auch die NFATc1-abhängige Genexpression reguliert, wurde der Einfluss von IL-6 auf die RCAN1-mRNA-Expression untersucht. Hierzu wurden NKC-Zellen mit Kontroll-siRNA oder gegen NFATc1 gerichtete siRNA transfiziert und anschließend mit IL-6 stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass nach genetischer Depletion von NFATc1 keine IL-6-abhängige RCAN1-mRNA-Expressionszunahme zu beobachten ist (Abb. 25). Dies lässt darauf schließen, dass IL-6 die Bindung von NFATc1 an Enhancerregionen sowie die Bindung von STAT3 an Promotorregionen fördert und dadurch vermehrt Transkription ausgewählter Zielgene stattfinden kann.



**Abbildung 25: IL-6 erhöht die RCAN1 mRNA-Expression nur in NKC-Zellen mit NFATc1.** **(A)** In NKC-Zellen ohne NFATc1-Knockdown kommt es nach der Gabe von IL-6 nach 24 Stunden im Vergleich zur Gabe der Kontrolle (sf) zu einer erhöhten Expression der RCAN1-mRNA. In Zellen mit NFATc1-Knockdown **(B)** kommt es dagegen nicht zu einem signifikanten Anstieg der RCAN1-mRNA unter IL-6 Gabe. **(C)** Knockdownkontrolle der verwendeten Zelllinien

## 5.6 Der transgene Verlust von STAT3 führt nicht zur erwarteten längeren Lebensdauer von NFATc1<sup>+/-wt</sup>, LSL-KRAS<sup>G12D</sup>, p48(Pdx1)-Cre-Mäuse

Um die Relevanz der NFATc1-STAT3-Interaktion auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms *in vivo* zu evaluieren, wurde eine transgene Maus generiert, die neben der konstitutiven Aktivierung von NFATc1 auch eine Depletion von STAT3 aufweist. Die bis dato vorgestellten Daten dieser Doktorarbeit ergaben sich allesamt aus Analysen der NFATc1<sup>+/-wt</sup>, LSL-KRAS<sup>G12D</sup>, p48(Pdx1)-Cre-Mäusen (NKC) sowie aus Pankreastumorzelllinien derselben. Diese neu generierten Mäuse werden im Folgenden als

**homozygote (homo) KNS-Maus**  
**(STAT3<sup>-/-</sup>, NFATc1<sup>+/-wt</sup>, LSL-KRAS<sup>G12D</sup>, p48(Pdx1)-Cre)**

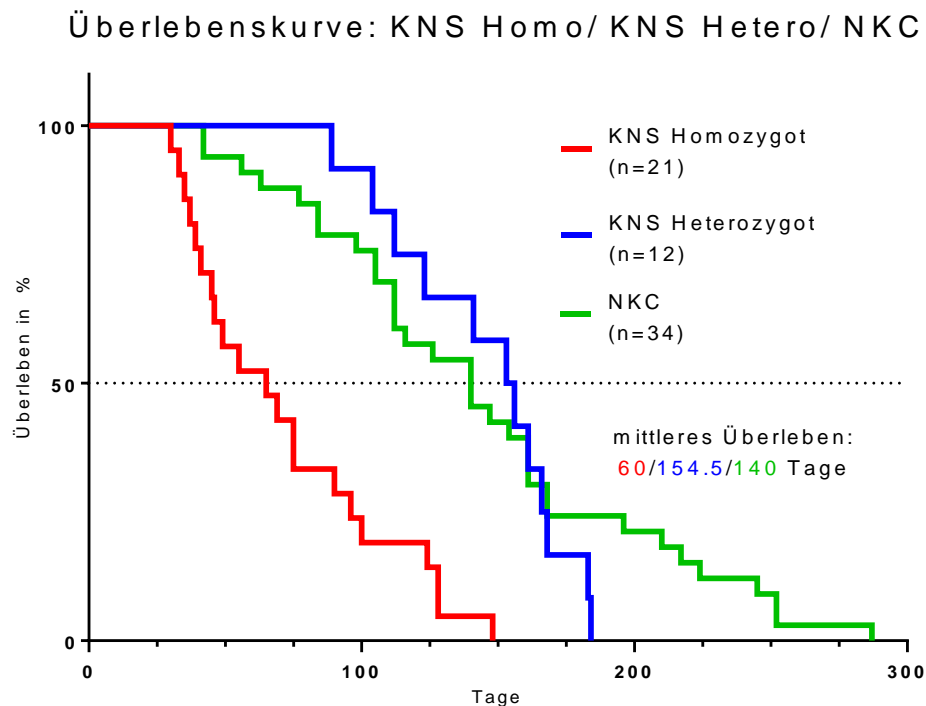
und

**heterozygote (hetero) KNS-Maus**  
**(STAT3<sup>wt/-</sup>, NFATc1<sup>+/-wt</sup>, LSL-KRAS<sup>G12D</sup>, p48(Pdx1)-Cre)**

bezeichnet. Das Kreuzungsschema zur Gewinnung dieser Maus ist im Methodenteil unter dem Unterpunkt Zuchtlinien (4.1.1.) detailliert erläutert.

Um einen ersten Anhalt zu bekommen, welche Auswirkungen diese transgenen Veränderungen auf das Überleben der verwendeten Mauslinien besitzt, wurde eine repräsentative Gruppe von Mäusen bis zum Versterben beobachtet, um anschließend die Todeszeitpunkte in eine Überlebenskurve einzutragen (Abb. 26). In dieser Kurve wurde gezeigt, dass die heterozygoten KNS-Mäuse eine ähnliche mittlere Überlebenszeit (154.5 Tage) haben wie die vormals bereits beschriebenen NKC-Mäuse (140 Tage). Mit nur 60 Tagen zeigen die homozygoten KNS-Mäuse dagegen ein signifikant kürzeres Überleben verglichen mit beiden vorher beschriebenen Vergleichsgruppen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der weitere Fokus der Experimente auf den Unterschied zwischen homozygoten KNS- sowie NKC-Mäusen gelegt.



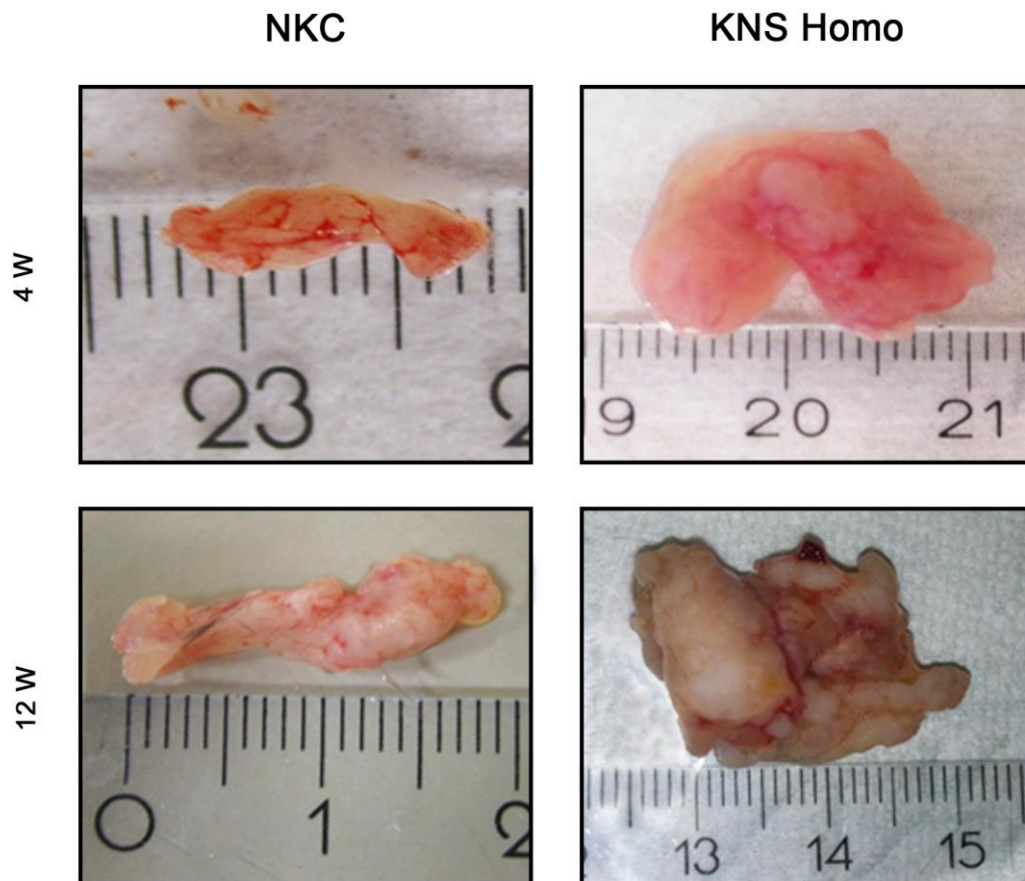


**Abbildung 26: Überlebenskurve KNS-Homo/KNS-Hetero/NKC nach Kaplan-Meier.** Die Darstellung zeigt das individuelle Überleben, die Anzahl der beobachteten Mäuse sowie das mittlere Überleben von drei verschiedenen transgenen Mauslinien.  
 KNS-Homozygot: STAT3<sup>-/-</sup>, NFATc1<sup>+/-wt</sup>, LSL-KRAS<sup>G12D</sup>, p48(Pdx1)-Cre;  
 KNS-Heterozygot: STAT3<sup>wt/-</sup>, NFATc1<sup>+/-wt</sup>, LSL-KRAS<sup>G12D</sup>, p48(Pdx1)-Cre;  
 NKC: NFATc1<sup>+/-wt</sup>, LSL-KRAS<sup>G12D</sup>, p48(Pdx1)-Cre

## 5.7 Homozygote KNS-Mäuse zeigen im Vergleich zum NKC-Mäusen deutlich vergrößerte Pankreastumoren zu Referenzzeitpunkten

Neben der reinen Überlebenszeit wurden einige repräsentative Mäuse nach 4,8 bzw. 12 Wochen geopfert, um den Progress des Pankreastumors sowie mögliche Metastasierungen zu erkennen und vergleichen zu können. Die in Abbildung 27 dargestellten Pankreastumore zeigen, dass die Neoplasien in den homozygoten KNS-Mäusen deutlich größer sind als die Vergleichstumore in NKC-Mäusen. Weiterhin zeigten die Tumoren der homozygoten KNS-Mäuse ein deutlich festeres Tumorgewebe, was häufig kaum mit dem Skalpell zu Präparation durchgeschnitten werden konnte. Trotz der Größe der Tumoren zeigte von allen untersuchten homozygoten Mäusen nur eine Maus mikrosko-

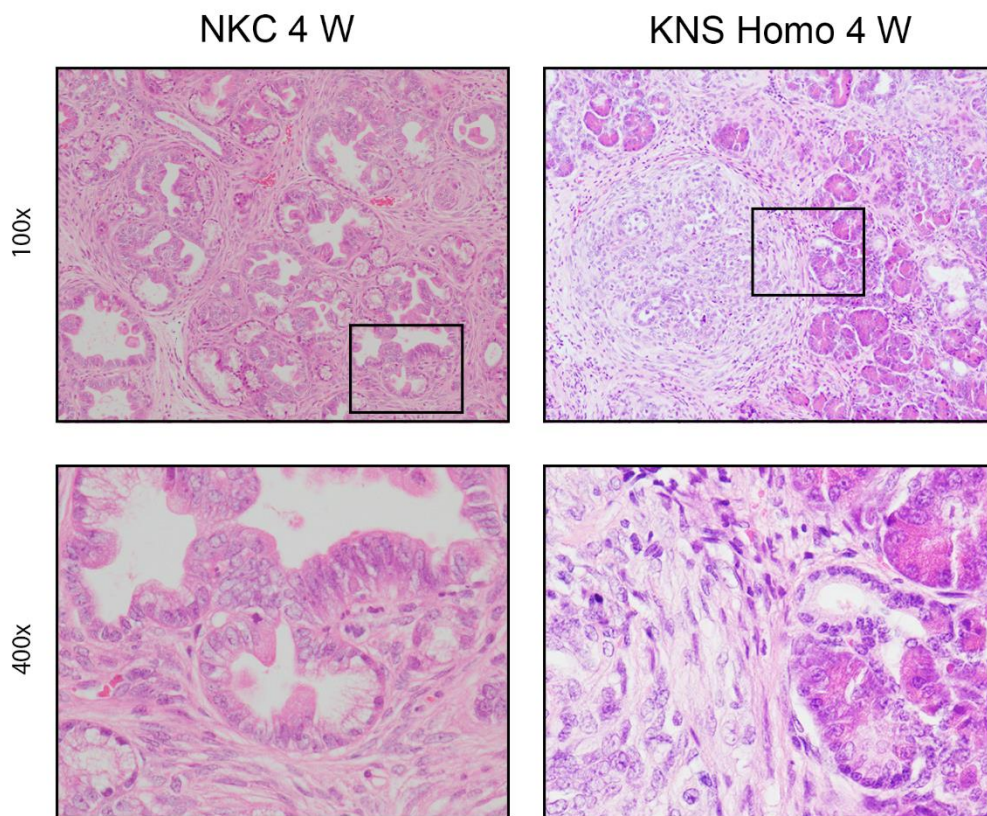
pisch sichtbare Lebermetastasen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde bereits beschrieben, dass die NKC-Mäuse sehr häufig Lebermetastasen entwickelten (Baumgart et al. 2014).



**Abbildung 27: Homozygote KNS-Mäuse zeigen deutlich größere und solidere Tumoren als NKC-Mäuse nach 4 und 12 Wochen.** Darstellung von vier Pankreastumoren nach Entnahme sowie kurzer Reinigung in PBS. Die unterschiedlichen Farbverhältnisse resultieren hauptsächlich aus unterschiedlichen Lichtverhältnissen zum Zeitpunkt der Bildaufnahme.

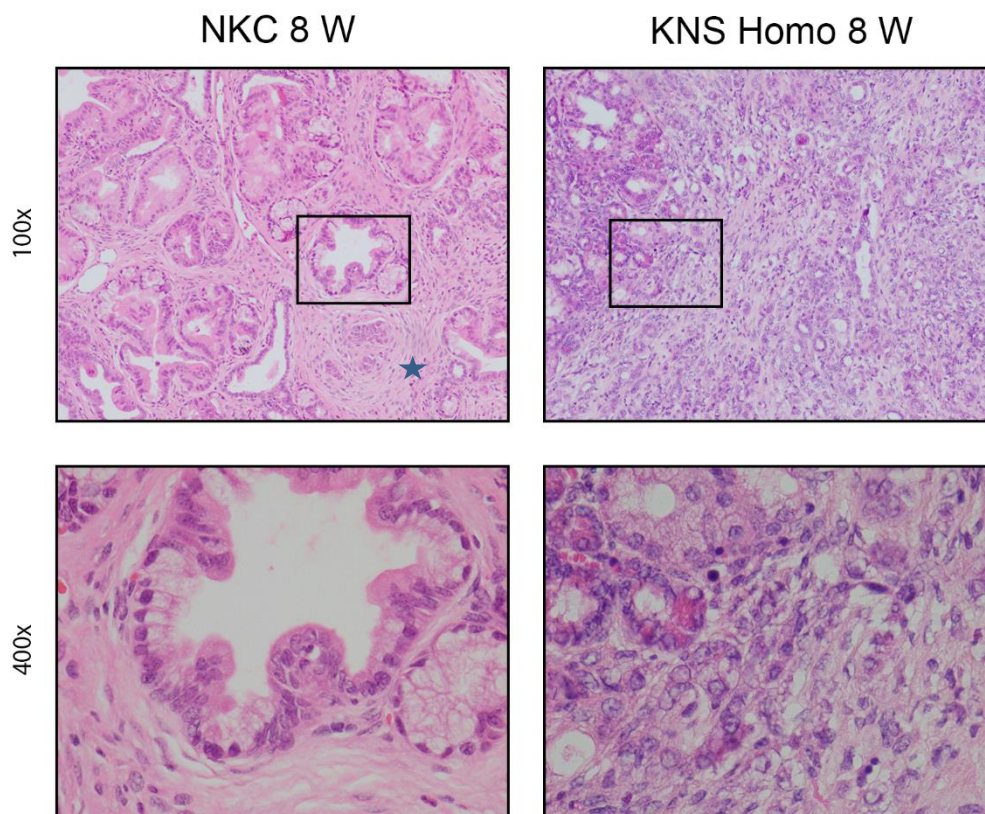
### 5.8 Homozygote KNS-Mäuse zeigen eine deutlich schnellere Karzinomentwicklung sowie einen erhöhten Stromanteil im Karzinom

Zur histologischen Evaluierung der Unterschiede zwischen NKC und homozygoten KNS-Mäusen wurden homozygote KNS-Mäuse nach 4,8 und 12 Wochen geopfert und mit den bereits vorhandenen Daten der NKC-Mäuse verglichen. Die in Abbildung 28 dargestellten H&E-Färbungen zeigen, dass es in KNS-Homo-Mäusen bereits nach 4 Wochen zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms kommt, während der repräsentative histologische Schnitt aus einer NKC-Maus überwiegend regelgerechtes Pankreasgewebe sowie PanINs zeigt und noch keine klaren Karzinomstrukturen erkennen lässt.



**Abbildung 28: HE-Färbungen der Pankreata von NKC- und KNS-Homo-Mäusen nach 4 Wochen.** KNS Homo-Mäuse zeigen nach 4 Wochen bereits Anteile eines invasiven Pankreaskarzinoms, während in NKC-Mäusen mehrheitlich PanIN-Läsionen oder regelgerechtes Pankreasgewebe sichtbar sind.

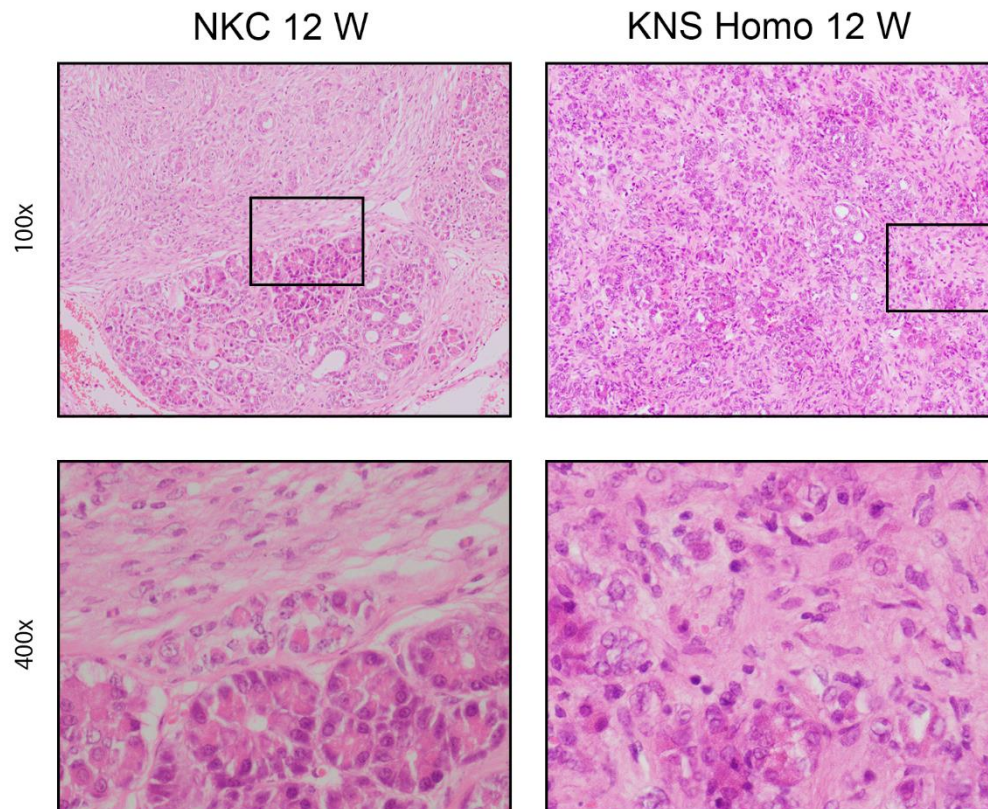
Die in Abbildung 29 dargestellten histologischen Schnitte nach 8 Wochen zeigen ein ähnliches, wenn auch deutlich weiter fortgeschrittenes, Bild. Hier ist noch deutlicher erkennbar, dass die KNS-Homo-Mäuse bereits ein invasives Karzinom entwickelt haben und kaum funktionales Pankreasgewebe auffindbar ist. Die NKC-Mäuse dagegen zeigen vermehrte PanIN-Läsionen sowie einige kleine karzinomsuspekte Areale (Abb. 29, 100x, mit einem Stern markiert).



**Abbildung 29: HE-Färbungen der Pankreata von NKC- und KNS-Homo-Mäusen nach 8 Wochen.** NKC-Mäuse zeigen nach 8 Wochen weiterhin mehrheitlich PanIN-Läsionen, während in homozygoten KNS-Mäusen bereits ein großer Anteil des Pankreas vom Karzinom durchsetzt ist.

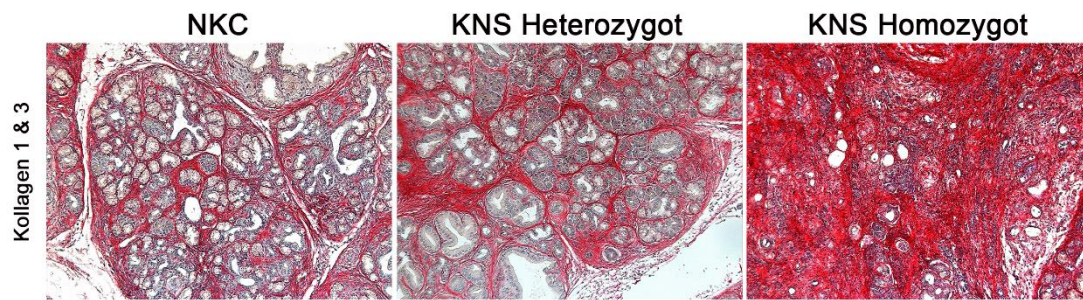
Nach 12 Wochen (Abb. 30) sind auch in den NKC-Mäusen klare Tumorstrukturen histologisch nachweisbar, jedoch lassen sich weiterhin noch nicht vom Karzinom befallene und vermutlich funktionale Regionen abgrenzen. Die KNS-Homo-Maus dagegen zeigt das volle Bild eines invasiven Pankreaskarzinoms, im histologischen Schnitt lässt sich kaum intaktes Restgewebe abgrenzen.





**Abbildung 30: HE-Färbungen der Pankreata von NKC- und KNS-Homo-Mäusen nach 12 Wochen.** Nach 12 Wochen sind in den NKC-Mäusen Tumorstrukturen nachweisbar, direkt benachbart zu intaktem Pankreasgewebe. Die homozygoten KNS-Mäuse weisen das volle Bild eines invasiven Pankreaskarzinoms auf ohne intaktes Restgewebe

Da die Pankreastumoren, die sich in den homozygoten KNS-Mäusen entwickelt haben, eine sehr solide makroskopische Struktur aufwiesen und nur unter großem Krafteinsatz präpariert werden konnten, wurde durch histologische Färbungen der Stromaanteil (Kollagen 1 und Kollagen 3) der Tumoren sichtbar gemacht. Diese Färbungen zeigten (Abb. 31), dass die Pankreastumore der homozygoten KNS-Mäuse einen deutlich erhöhten Stromaanteil im Vergleich zu den NKC-Mäusen sowie den heterozygoten KNS-Mäusen besaßen.



**Abbildung 31: Kollagenfärbung (Kollagen 1&3) von 8-Wochen alten NKC-, KNS-Hetero- und KNS-Homo-Mäusen.** In den KNS-Homo-Mäusen ist nach 8 Wochen ein deutlich erhöhter Stromaanteil sichtbar.

## 5.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass die NFATc1-abhängige transkriptionelle Regulation onkogener Gensignaturen die Bindung des Transkriptionsfaktors an Enhancerregionen ausgewählter Zielgene voraussetzt. Im Gegensatz dazu zeigten ChIP-Analysen, dass das NFATc1-Partnerprotein STAT3 an den jeweiligen Promotoren NFATc1-kontrollierter Zielgene bindet. Darüber hinaus werden sowohl die NFATc1-Bindung an dessen Zielgenen sowie deren transkriptionelle Aktivierung durch NFATc1 maßgeblich von der Aktivität des IL-6-STAT3-Signalwegs determiniert.

Um die biologische Relevanz dieser Interaktion *in vivo* zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das zusätzlich zu den konstitutiven Aktivierungen von KRAS und NFATc1 einen homozygoten bzw. heterozygoten Verlust der STAT3-Expression im Pankreas aufweist. Diese Mäuse zeigten entgegen der Erwartungen eine beschleunigte Pankreaskarzinomprogression und eine deutlich verringerte mittlere Überlebenszeit von nur 60 Tagen gegenüber ihren Wurfgeschwistern ohne pankreasspezifischen STAT3-Verlust. Morphologisch waren die Pankreaskarzinome STAT3-defizienter Mäuse durch eine ausgeprägte Zunahme des stromalen Tumoranteils gekennzeichnet.

## 6 Diskussion

Eine chronische Entzündungsreaktion im Kontext einer KRAS<sup>G12D</sup>-Mutation gilt als zentrales Ereignis in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms (Baumgart et al. 2014; Guerra et al. 2015). Unsere Arbeitsgruppe hat in Vorarbeiten den inflammatorischen Transkriptionsfaktor NFATc1 in der inflammations-getriggerten Pankreaskarzinogenese untersucht (Baumgart et al. 2014; Chen et al. 2015). Um die NFATc1-abhängigen Funktionen während der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms weiter charakterisieren zu können, wurde ein transgenes Mausmodell geschaffen, das neben der onkogenen Aktivierung von KRAS auch eine konstitutiv nukleäre Form von NFATc1 exprimiert (NKC-Maus) (Baumgart et al. 2014). Diese Mäuse wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren mit isolierter konditionaler Aktivierung von KRAS eine deutliche Beschleunigung der Tumorentwicklung sowie eine geringere mittlere Überlebenszeit auf (siehe Abb. 3) (Baumgart et al. 2014). Da NKC-Mäuse weiterhin im Vergleich zu ihren KRAS<sup>G12D</sup>-Wurfgeschwistern eine erhöhte Expression von STAT3 zeigten und die NFATc1-Bindung an seine Zielgene durch Interaktionspartner wie STAT3 stabilisiert wird (Rao et al. 1997; Wu et al. 2015; Baumgart et al. 2013), wurde der weitere Fokus der Experimente auf die mögliche funktionelle Kooperation von STAT3 und NFATc1 im Pankreaskarzinom gelegt.

In Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen wurde STAT3 bereits als proonkogener Faktor in der Entstehung des Pankreaskarzinoms identifiziert (Lesina et al. 2011; Lesina et al. 2014). Daher galt es als Ziel dieser Arbeit, die Rolle von STAT3 in der NFATc1-abhängigen Pankreaskarzinogenese und -progression mechanistisch zu untersuchen. Dabei lag ein besonderer Fokus auf der Charakterisierung der transkriptionellen Kontrolle gemeinsamer onkogener Gensignaturen durch die inflammatorischen Transkriptionsfaktoren NFATc1 und STAT3.

Darüber hinaus wurde *in vivo* untersucht, welche Rolle der transgene Verlust von STAT3 im Kontext der konstitutiven Aktivierungen von NFATc1 und KRAS in der Pankreaskarzinogenese spielt.

## 6.1 Die Rolle von NFATc1-Partnerproteinen in der Transkriptionskontrolle

Aufgrund der schwachen DNA-Bindungsaffinität von NFATc1 alleine muss der Transkriptionsfaktor mit Partnerproteinen interagieren, um transkriptionelle Vorgänge suffizient regulieren zu können (Baumgart et al. 2013). Neben STAT3 wurden in den vergangenen Jahren eine Vielzahl direkter und indirekter NFAT-Interaktionspartner identifiziert (Chen et al. 2015; Baumgart et al. 2012; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010; S. K. Singh et al. 2015). Dabei formt NFAT im Pankreas sowohl Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren (Elk1, AP1-Proteine, Sox2, STAT3), interagiert aber ebenso mit Chromatin-modifizierenden Proteinen (Suv39H1, p300) (Chen et al. 2015; Baumgart et al. 2012; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010; S. K. Singh et al. 2015). In Abhängigkeit der Auswahl der NFAT-Partnerproteine hat die NFAT-vermittelte Transkription sowohl aktivierende, als auch reprimierende Eigenschaften (Baumgart et al. 2012; König, Linhart, et al. 2010). Die starken Überlappungen der genomweiten NFATc1-Bindungen mit Histonmodifikationen, die die Aktivierungen von Enhancern anzeigen, deutet jedoch darauf hin, dass NFATc1 zumindest im Kontext der konstitutiven Aktivierung Transkriptionsvorgänge präferenziell aktiviert (Baumgart et al. 2014).

In Abhängigkeit der Partnerproteine bindet NFATc1 unterschiedliche Gensignaturen und kontrolliert diverse biologische Funktionen im Pankreaskarzinom (Baumgart et al. 2013).

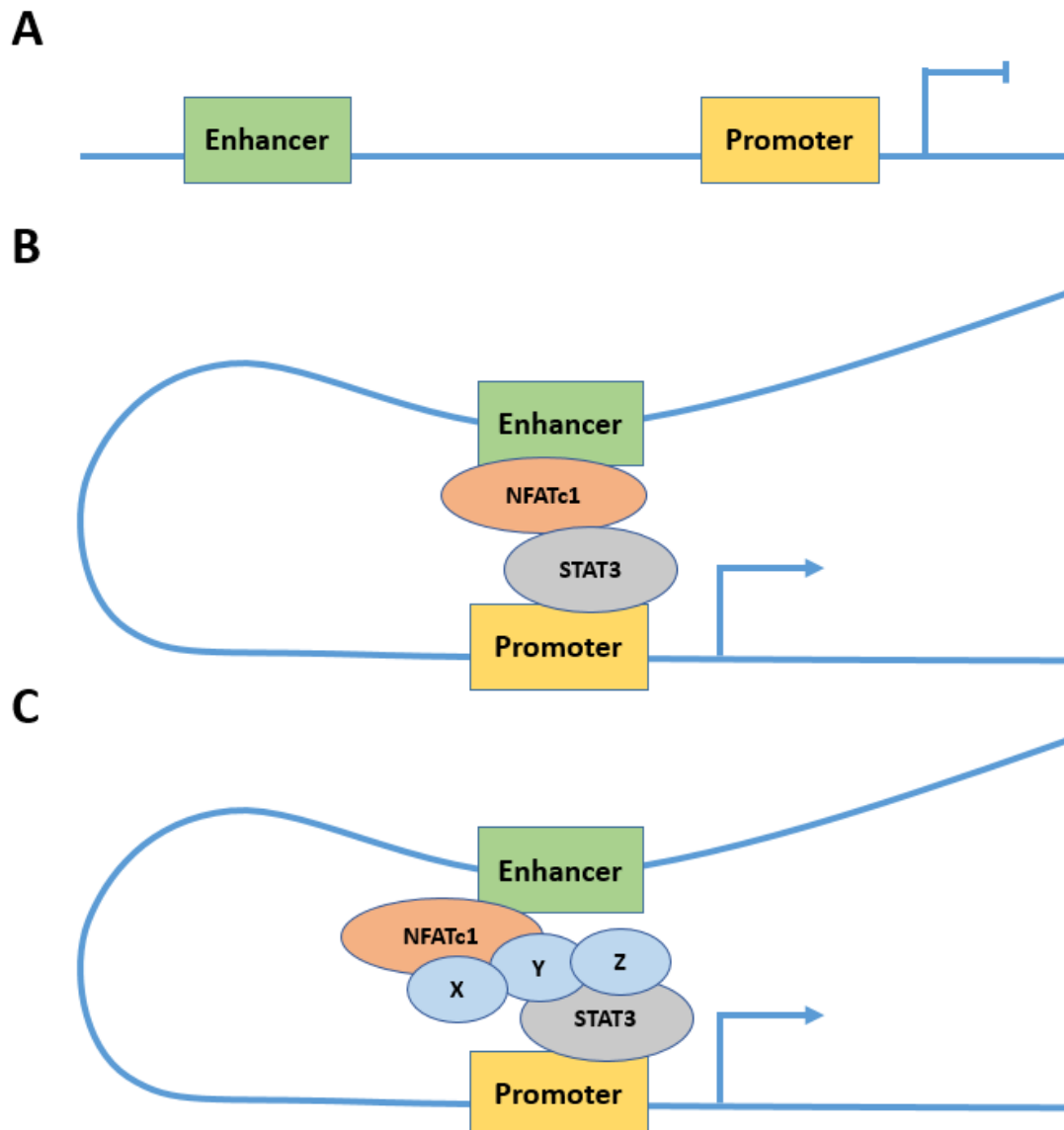
Eines der ersten Proteine, das als NFATc1-Bindungspartner identifiziert wurde, ist das activator protein 1 (AP-1) (Chen et al. 1998; Macián et al. 2001). AP-1 interagiert mit NFATc1 vor allem im Rahmen der Aktivierung von T-Zellen, man geht aber heute ebenfalls davon aus, dass AP-1 in der NFATc1-abhängigen Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt (Mancini & Toker 2009; Macian 2005; Wu et al. 2010). Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass NFATc1 unter Kontrolle des EGFR-Signalwegs mit dem AP1-Protein c-Jun einen Komplex bildet und eine tragende Rolle in der entzündungsvermittelten Karzinogenese des Pankreas spielt (Chen et al. 2015). In etablierten Pankreaskarzinomen interagiert NFATc1 mit ets-like factor ELK1 und fördert durch transkriptionelle Aktivierung von c-Myc die Zellzyklusprogression und somit die Proliferation von Tumorzellen (König, Linhart, et al. 2010). Eine ähnliche biologische Funktion hat auch die Interaktion von NFATc2 mit der Histonmethyltransferase Suv39H1, die nach Rekrutierung durch den Transkriptionsfaktor durch lokale Induktion von Heterochromatin



den Promotor des Tumorsuppressorgens p15<sup>Ink4b</sup> transkriptionell reprimiert (Baumgart et al. 2012).

## 6.2 NFATc1 und STAT3 bilden einen Komplex, welcher durch Enhancer-Promotor- Kommunikation die Transkription von onkogenen Faktoren im Pankreaskarzinom fördert

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Doktorarbeit vorgestellt wurden, ergaben, dass NFATc1 primär an Enhancerregionen und STAT3 primär an Promotorregionen ausgewählter Zielgene bindet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass STAT3 die NFATc1 – Bindung an Enhancerregionen reguliert, obwohl STAT3 selbst nicht oder nur in sehr geringem Maße an diesen Enhancerregionen bindet. Neben diesem direkten Einfluss von STAT3 auf NFATc1 zeigte sich ebenso, dass auch die Gabe von Interleukin-6, ein bekannter Aktivator des JAK2-STAT3-Signalweges, die Bindungsaffinität von NFATc1 an Enhancerregionen ausgewählter Zielgene reguliert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NFATc1 und STAT3 einen Enhancer-Promotor-Komplex bilden, um die Transkription gemeinsamer Zielgene wie RCAN1 zu beeinflussen (Abb. 32). Ein denkbare mechanistisches Szenario für diese Hypothese ist die Ausbildung einer Loopformation zwischen Enhancer und Promotor (Marsman & Horsfield 2012; Nolis et al. 2009; Krivega & Dean 2012). Bei der Loopformation handelt es sich um einen Mechanismus der Transkriptionskontrolle, bei dem ein räumlicher Kontakt zwischen Enhancer- bzw. Promotorbindenden Proteinen hergestellt wird, der in einer Aktivierung des Promotors und einer Zunahme der transkriptionellen Aktivität resultiert (Kadauke & Blobel 2009). In diesem Fall wird davon ausgegangen, dass die NFATc1-Bindung an den Enhancer sowie die STAT3-Bindung an den Promotor gemeinsamer Zielgene zu einer räumlichen Annäherung zwischen Enhancer und Promotor führt (Abb. 32B). Dabei ist es denkbar, dass noch weitere Bindungspartner (Abb. 32C) an der Komplexbindung beteiligt sind und diese Interaktion stabilisieren, um die Transkription des jeweiligen Zielgens zu ermöglichen.



**Abbildung 32: Schematische und vereinfachte Darstellung des propagierten Enhancer-Promotor Loopings durch NFATc1 und STAT3 in NKC-Zellen. (A)** Schematische Darstellung eines inaktiven Gens, es findet keine Transkription statt. **(B)** Enhancer und Promotor nähern sich durch die Bindung von NFATc1 an den Enhancer und STAT3 an den Promotor. Die Bindung von STAT3 und NFATc1 erfolgt in dieser schematischen Darstellung direkt aneinander. **(C)** Enhancer und Promotor nähern sich wie in (B) durch die Bindung von NFATc1 und STAT3, zur Loop-Formation werden allerdings in diesem Modell noch weitere Bindungspartner (X,Y,Z) benötigt. Schematische Darstellung in Anlehnung an Marsman und Horsfield, 2012.

Leider war es im Rahmen der Dissertation nicht möglich, einen 3C (Capturing Chromosome Conformation)-Assay durchzuführen, um die Hypothese der Loopformation experimentell zu verifizieren. Weiterhin erlauben die gewonnenen Daten keinen Rückschluss darauf, in wie weit NFATc1 und STAT3 direkt über eine Loop-Formation miteinander

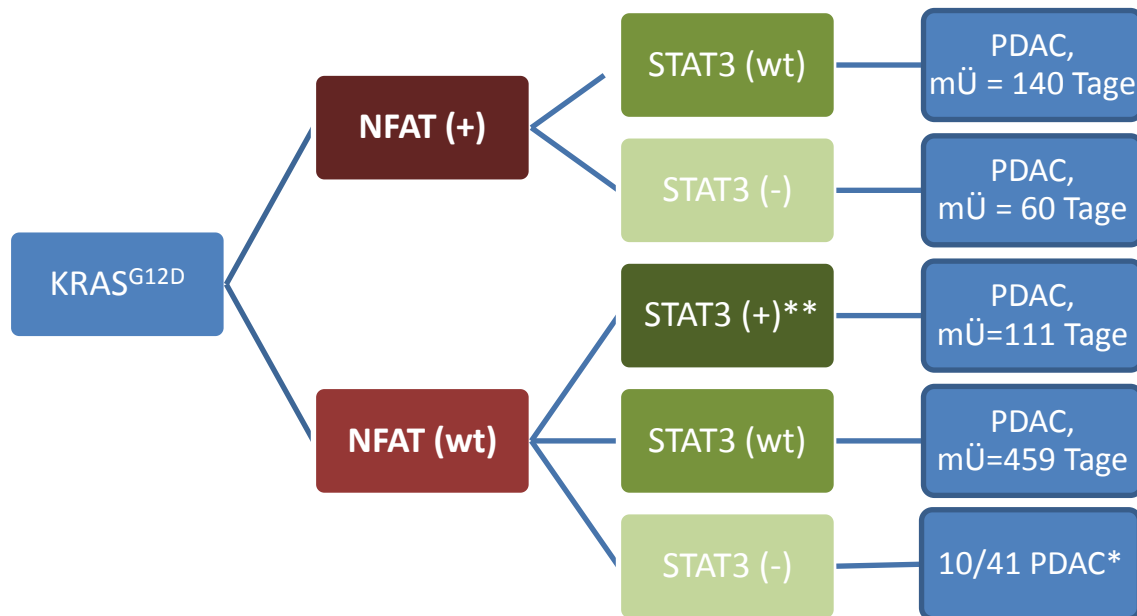
agieren oder ob es noch einen oder mehrere weitere Partner gibt, die diesen Komplex stabilisieren. Weitere Interaktionsstudien (Co-IP Experimente, GST-Pulldown *in vitro*) wären notwendig, um diesen Fragestellungen nachzugehen.

Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit lag auf der NFATc1:STAT3-abhängigen epigenetischen Transkriptionskontrolle im Kontext einer onkogenen KRAS<sup>G12D</sup>-Aktivierung. Obwohl für die in der ChIP-Seq identifizierten und hier näher charakterisierten gemeinsamen Zielgene der beiden Transkriptionsfaktoren im Pankreaskarzinom onkogene Eigenschaften in der Literatur beschrieben sind (Baumgart et al. 2014; Remo et al. 2015; Neesse et al. 2014; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010; Baumgart et al. 2013), lassen die hier gezeigten Daten keinen Rückschluss darauf zu, inwiefern die NFATc1:STAT3-abhängige Genexpressionskontrolle die Entstehung oder Progression des Pankreaskarzinoms beeinflusst.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde daher ein tetragenes Mausmodell geschaffen und charakterisiert, das neben den konstitutiven Aktivierungen von NFATc1 und KRAS auch einen Verlust der STAT3-Expression aufweist.

### 6.3 Homozygoter STAT3-Knockout führt zu einer signifikanten verringerten mittleren Überlebenszeit im Vergleich zu NKC-Mäusen

Aufgrund der zentralen Funktion von STAT3 als NFATc1-Partnerprotein und der hier gezeigten gemeinsamen transkriptionellen Aktivierung proonkogener Zielgene vermuteten wir, dass der transgene Verlust von STAT3 im Kontext einer konstitutiven Aktivierung von NFATc1 zu einer Verzögerung der Pankreaskarzinogenese und Tumorprogression führt. Diese Hypothese wurde untermauert durch bereits publizierte Arbeiten, die zeigten, dass der Verlust von STAT3 im Pankreas im Kontext einer KRAS<sup>G12D</sup>-Mutation die Bildung von PanIN-Läsionen reduziert (Lesina et al. 2011). In der gleichen Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass eine konstitutive Aktivierung von STAT3 im Pankreas, welche durch einen pankreasspezifischen Verlust von Socs3, einem direkten STAT3-Inhibitor, erreicht wurde, zu einem signifikant verringerten mittleren Überleben führt (Lesina et al. 2011) (Abbildung 33, Maus gekennzeichnet mit \*\*).



**Abbildung 33: Schematische Darstellung der verschiedenen untersuchten transgenen Mäuse im Kontext einer KRAS<sup>G12D</sup>-Aktivierung.** mÜ = mittleres Überleben, (+) = konstitutive Aktivierung, (wt) = Wildtyp, (-) = Knockout. Die Ergebnisse bezüglich der Entstehung von dukalen Adenokarzinomen im Pankreas (PDAC) sowie der mittleren Überlebenszeit der Mäuse mit NFAT-Wildtyp stammen aus zwei Publikation (Lesina et al. 2011; Baumgart et al. 2014). \* = 10 von 41 Mäusen entwickelten ein Karzinom. \*\* STAT3 (+): Überexpression von STAT3 wegen fehlender Inhibition durch Socs3

Überraschenderweise führte aber die Kombination aus NFATc1-Aktivierung und STAT3-Verlust in der KNS-Maus nicht wie erwartet zu einer Reduktion der NFATc1-abhängigen Tumorprogression, sondern verkürzte das mittlere Überleben homozygoter KNS-Mäuse signifikant. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Einfluss von STAT3 auf die NFATc1-getriggerte Karzinogenese *in vivo* weniger bedeutend ist, als bislang vermutet. Gleichzeitig unterstreichen diese Daten die herausragende Rolle von NFATc1 in der Pankreaskarzinogenese und Progression. Es ist denkbar, dass NFATc1 in Abwesenheit von STAT3 andere Partnerkomplexe eingeht und diese Auswahl der Partnerproteine einen noch schnelleren Progress des Pankreaskarzinoms bedingt, was sich in einem im

Vergleich zur NKC-Maus weiterhin reduziertem Überleben äußert. Globale Untersuchungen der NFATc1-Komplexbildung (wie beispielsweise Masspec-Untersuchungen nach Immunpräzipitation von NFATc1) im Kontext der STAT3 Expression oder Defizienz müssten durchgeführt werden, um diese Hypothese experimentell zu überprüfen. Im Gegensatz zu Mäusen mit einem homozygoten STAT3-Verlust war das mediane Überleben heterozygoter KNS-Mäuse im Vergleich zu NKC-Mäusen nicht signifikant verändert. Möglicherweise ist der heterozygote Verlust von STAT3 nicht ausreichend, um eine Komplexbildung von NFATc1 mit anderen Partnerproteinen zuzulassen, die eine deutliche Progressionszunahme des Pankreaskarzinoms bewirken können, sodass weiterhin NFATc1:STAT3-abhängige Gensignaturen kontrolliert werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die akzellerierte Tumorprogression homozygoter KNS-Mäuse ist die NFATc1-abhängige Regulation alternativer Gensignaturen in der Abwesenheit von STAT3. Hierfür spricht auch der auffällig stromareiche Phänotyp der homozygoten KNS-Mäuse, der eine Aktivierung von Zielgenen stromamodulierender Faktoren suggeriert. Die heterozygoten KNS-Mäuse dagegen zeigten einen ähnlich hohen Stromaanteil wie die NKC-Mäuse, sodass vermutlich auch hier ein heterozygoter Verlust von STAT3 nicht ausreichend ist, um die Morphologie des Tumors entscheidend zu verändern.

Die Rolle des Tumorstromas wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert: Während einige Arbeiten davon ausgehen, dass ein hoher Stromaindex zu einem signifikant längeren Überleben führt (Rhim et al. 2014; Özdemir et al. 2014), da es den Körper vor Metastasierung des Primärtumors schützt, gehen andere Autoren davon aus, dass ein vermehrtes Tumorstroma das Anfluten von Chemotherapeutika behindert und somit die Prognose des Pankreaskarzinoms verschlechtert (Erkan et al. 2008). Im Falle der homozygoten KNS-Mäuse liegt die Vermutung nahe, dass der histologisch sichtbare deutlich erhöhte Stromaanteil die verminderte mittlere Überlebenszeit dieser Mäuse im Vergleich zu den NKC-Mäusen erklären könnte.

Dass diese Ergebnisse im Kontext eines artifiziellen Settings, sprich einer dauerhaften Expression von NFATc1 sowie einer KRAS<sup>G12D</sup>-Aktivierung gewonnen wurden, die im Gegensatz zu der Karzinogenese beim Menschen im Mausmodell bereits von Geburt an vorhanden ist und sich nicht erst im Laufe des Lebens entwickelt, muss bei der Interpretation weiterhin bedacht werden..

## 6.4 Die Rolle von NFAT und STAT3 in der Therapie des humanen Pankreaskarzinoms

Die Ergebnisse in dieser Dissertationsarbeit sowie diverse Vorarbeiten deuten darauf hin, dass NFATc1 eine entscheidende Rolle in der Regulation des Pankreaskarzinoms beim Menschen spielt (Chen et al. 2015; Buchholz et al. 2006; Buchholz & Ellenrieder 2007; Arlt et al. 2012; Baumgart et al. 2014). Jedoch gibt es bis heute keine klinischen Studien, ob die Anwendung von bekannten Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A (CsA) oder FK506 (Tacrolimus) zu einer signifikanten Prognoseverbesserung bei inoperablen Pankreaskarzinomen führt. Beide Medikamente werden bereits seit vielen Jahren klinisch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder in der Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation eingesetzt (Molnar et al. 2015; Scalea et al. 2015; Malvezzi & Rostaing 2015; Yoon 2010). Das schmale therapeutische Fenster dieser Medikamente sowie die möglichen Nebenwirkungen wie beispielsweise Nephrotoxizität oder ein neu aufgetretener Diabetes Mellitus schränken die Anwendung dieser Medikamente in der Tumorthherapie allerdings ein und erfordern eine genaue Kosten-Nutzen-Analyse (Scalea et al. 2015; Malvezzi & Rostaing 2015).

In präklinischen Modellen zeigt die Inhibition des Calcineurin-NFAT Signalwegs allerdings vielversprechende Ergebnisse, die für die Initiation klinischer Studien mit dem Nebenwirkungsspektrum dieser Medikamente abgewogen werden müssen. Im Kontext der AML liegen allerdings bereits klinische Daten bezüglich der Therapie mit Cyclosporin A vor (Metzelder et al. 2015). Es konnte in einem Patientenkollektiv mit AML gezeigt werden, dass die Gabe von Cyclosporin A ein besseres Ansprechen der Patienten auf den FLT-3 Inhibitor Sorafenib bewirkt und damit auch insgesamt zu einem verlängerten Überleben dieser Patientengruppe führt (Metzelder et al. 2015).

In eigenen Daten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der Einsatz der NFATc1-Inhibitoren CsA und Zoledronsäure in Nacktmäuse mit implantiertem Pankreastumor zu einer verringerten Progression des Tumors führt (Singh et al. 2011). Auch eine genetische Inhibition von NFATc1 im Kontext einer KRAS<sup>G12D</sup>-Mutation bedingt eine deutlich verlangsamte Karzinogenese und Tumorprogression (Chen et al. 2015).

In Zusammenschau aller dieser Daten scheint es sinnvoll, NFATc1 im Pankreaskarzinom pharmakologisch zu inhibieren, wenn eine Überexpression vorher durch molekular-

biologische Analysen nachgewiesen werden konnte. Da es aber aktuell noch keine spezifischen Inhibitoren von NFATc1 im Tumorsetting gibt, ergeben sich zwei Möglichkeiten für die Zukunft dieses Therapieansatzes: Entweder müssen durch weitere pharmakologischer Forschung spezifische Substanzen geschaffen werden, die NFATc1 selektiv in der Tumorzelle hemmen können und damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Nebenwirkungen verringern könnten, oder man konzentriert sich darauf, nicht NFATc1 direkt, sondern Bindungspartner von NFATc1 zu inhibieren, um über diesen Umweg NFATc1-abhängige onkogene Funktionen zu kontrollieren. Einer dieser Inhibitoren könnte das bereits in klinischen Studien getestete Ruxolitinib sein.

Ruxolitinib, ein JAK1/JAK2-Inhibitor, der bereits für die Therapie der Myelofibrose zugelassen ist, wird derzeit für die Therapie des inoperablen Pankreaskarzinoms untersucht. In einer aktuellen Phase-II-Studie (Hurwitz et al. 2015) wurde der Effekt von Ruxolitinib plus Capecitabin, einer Vorstufe von 5-Fluoruracil, auf das Überleben von Patienten bei inoperablem Pankreaskarzinom im Vergleich zur Gabe von Capecitabin plus Placebo untersucht. Obwohl sich in dieser Studie keine signifikante Erhöhung der Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrolltherapie mit Capecitabin feststellen ließ, zeigte sich, dass Ruxolitinib in einer Subgruppe von Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom sowie systemischer Entzündung (gemessen anhand der CRP-Konzentration) zu einem verlängerten Überleben führen kann. Mit einer mittleren Überlebenszeit von 4,5 Monaten lag der Wert für Patienten bei Ruxolitinibgabe deutlich unter der mittleren Überlebenszeit der aktuellen Standardtherapien bei inoperablem Pankreaskarzinom, mit FOLFIRINOX bei 11,1 Monaten und nab-Paclitaxel bei 8,5 Monaten (Conroy et al. 2011; Von Hoff et al. 2013). Allerdings handelt es sich bei der Ruxolitinib-Therapie auch um eine Second-Line Therapie, die erst nach Versagen der gängigen First-Line Therapie (FOLFIRINOX und nab-Paclitaxel) in Betracht kam. Aufgrund dieser Überlegung sowie den vielversprechenden Ergebnisse dieser Studie ist bereits eine Phase-III-Studie mit Ruxolitinib initiiert (NCT02117479).

Im Kontext der Daten dieser Dissertationsarbeit stellt sich folglich die Frage, ob die Patienten, die von der Ruxolitinib-Therapie einen Benefit erfahren haben, auch die Patienten sind, die wenig NFATc1 exprimieren. Leider gibt es keine Daten bezüglich der NFATc1-Expression der Pankreastumore der in der Studie inkludierten Patienten.

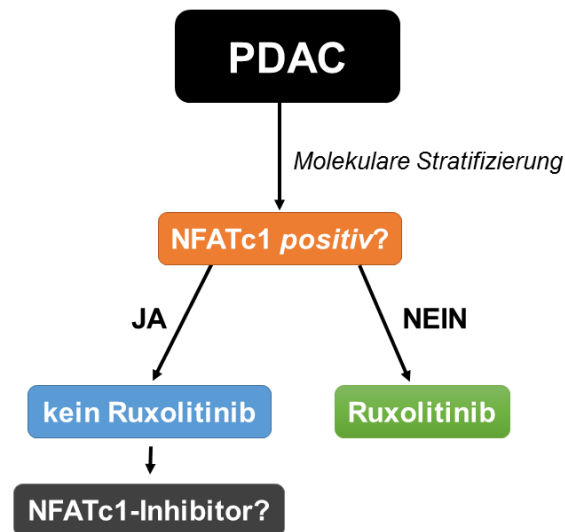
## 6.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die gewonnenen Daten dieser Dissertationsarbeit zeigen, dass NFATc1 und STAT3 in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms mechanistisch stark kooperieren. Jedoch war es überraschend, dass die homozygoten KNS-Mäuse, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, trotz eines pankreasspezifischen Verlusts von STAT3 eine signifikant verringerte mittlere Überlebenszeit als Vergleichsmäuse mit normaler STAT3-Expression besitzen, da es aktuell für das Pankreaskarzinom als gesichert gilt, dass STAT3 eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt (Lesina et al. 2014; Lesina et al. 2011; Shigekawa et al. 2012; Wake & Watson 2015) und eine Inhibition von STAT3 ein möglicher Therapieansatz in der Behandlung des Pankreaskarzinom darstellt (Hurwitz et al. 2015).

Einen möglichen Erklärungsansatz für dieses überraschende Ergebnis liefert die Theorie, dass NFATc1, welches bereits in vielen Vorarbeiten als wichtiger Faktor in der Entstehung und der Progression des Pankreaskarzinoms identifiziert wurde (Baumgart et al. 2014; Arlt et al. 2012; König, Fernandez-Zapico, et al. 2010; Buchholz et al. 2006; Buchholz & Ellenrieder 2007), sich im Setting eines kompletten Verlusts von STAT3, wie er in den homozygoten KNS-Mäusen zum Tragen gekommen ist, neue Bindungspartner sucht. Diese neuen Komplexe können zu einer erhöhten Transkription von Gensignaturen führen, die einerseits die Progression des Pankreaskarzinoms beschleunigen, andererseits aber auch zu einem deutlich erhöhten Stromaanteil im Tumor führen, was auch mit einer verschlechterten Prognose vereinbar sein kann (Erkan et al. 2008).

Diese Entdeckung kann auch im Kontext der aktuellen klinischen Studien mit Ruxolitinib diskutiert werden. Es ist möglich, dass genau die Patienten von Ruxolitinib nicht profitieren, die eine erhöhte Expression von NFATc1 im Tumor besitzen, da in diesem Setting sich NFATc1 unter Ruxolitinib und damit STAT3-Inhibition andere Bindungspartner sucht, die die Prognose des Patienten signifikant verschlechtern können. Im Umkehrschluss hilft Ruxolitinib dann möglicherweise genau den Patienten, die keine relevante Expression von NFATc1 im Tumor besitzen. Im Falle eines NFATc1-positiven Tumors könnte dann bei erfolgreicher Forschung in Zukunft auf eventuell vorhandene spezifische NFATc1-Inhibitoren zurückgegriffen werden.





**Abbildung 34:** Mögliches Schema zur molekularen Stratifizierung von Pankreastumoren zur weiteren Therapieplanung in Abhängigkeit des NFATc1-Status.

Daher scheint eine molekulare Stratifizierung, wie es in ähnlicher Form beispielsweise für das Mammakarzinom etabliert ist, auch im Setting eines Pankreaskarzinoms sinnvoll, da aus den Ergebnissen dieser Expressionsanalysen dann eine Subtypen-spezifische Therapie realisierbar wäre, in Abhängigkeit vom NFATc1-Status des Patienten (Abb. 34).

## 7 Literaturverzeichnis

- Akira, S. et al., 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 77, pp.63–71.
- Aramburu, J. et al., 2006. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), pp.1597–1604.
- Arlt, A., Schäfer, H. & Kalthoff, H., 2012. The “N-factors” in pancreatic cancer: functional relevance of NF- $\kappa$ B, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis*, 1(11), p.e35.
- Baumgart, S. et al., 2014. Inflammation-Induced NFATc1–STAT3 Transcription Complex Promotes Pancreatic Cancer Initiation by KrasG12D. *Cancer Discovery*, 4(6), pp.688–701.
- Baumgart, S. et al., 2012. Restricted Heterochromatin Formation Links NFATc2 Repressor Activity With Growth Promotion in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 142(2), pp.387–388.
- Baumgart, S., Ellenrieder, V. & Fernandez-Zapico, M.E., 2013. Oncogenic Transcription Factors: Cornerstones of Inflammation-Linked Pancreatic Carcinogenesis. *Gut*, 62(2), pp.310–316.
- Becker, A.E., 2014. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(32), p.11182.
- Biterge, B. & Schneider, R., 2014. Histone variants: key players of chromatin. *Cell and tissue research*, 356(3), pp.457–66.
- Bromberg, J., 2002. Stat proteins and oncogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), pp.1139–1142.
- Buchholz, M. et al., 2006. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca(2+)/calcineurin signaling pathway. *The EMBO Journal*, 25(15), pp.3714–3724.
- Buchholz, M. & Ellenrieder, V., 2007. An Emerging Role for Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin/NFAT Signaling in Cancerogenesis. *Cell Cycle*, 6(1), pp.16–19.

- Casanova, J.-L., Holland, S.M. & Notarangelo, L.D., 2012. Inborn Errors of Human JAKs and STATs. *Immunity*, 36(4), pp.515–528.
- Chen, L. et al., 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature*, 392(6671), pp.42–48.
- Chen, N.-M. et al., 2015. NFATc1 Links EGFR Signaling to Induction of Sox9 Transcription and Acinar–Ductal Transdifferentiation in the Pancreas. *Gastroenterology*, 148(5), pp.1024–1034.e9.
- Collins, M.A. et al., 2012. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(2), pp.639–653.
- Conroy, T. et al., 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*, 364(19), pp.1817–1825.
- Cook, N.R. et al., 2005. Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: The women’s health study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 294(1), pp.47–55.
- Corcoran, R.B. et al., 2011. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer research*, 71(14), pp.5020–5029.
- Cox, A.D. et al., 2014. Drugging the undruggable Ras: mission possible? *Nature reviews. Drug discovery*, 13(11), pp.828–851.
- Crabtree, G.R. & Olson, E.N., 2015. NFAT Signaling. *Cell*, 109(2), pp.S67–S79.
- Creyghton, M.P. et al., 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), pp.21931–21936.
- Darnell, J.E., 1997. STATs and Gene Regulation. *Science*, 277(5332), pp.1630–1635.
- DiMagno, E.P., 1999. Pancreatic cancer: clinical presentation, pitfalls and early clues. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 10 Suppl 4, pp.140–2.
- Duell, E.J. et al., 2012. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology*, 23(11), pp.2964–2970.
- Elgar, G. & Vavouri, T., 2008. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends in Genetics*, 24(7), pp.344–352.

- Erkan, M. et al., 2008. The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 6(10), pp.1155–1161.
- Fukuda, A. et al., 2011. Stat3 and MMP7 Contribute to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Initiation and Progression. *Cancer cell*, 19(4), pp.441–455.
- Garrido-Laguna, I. & Hidalgo, M., 2015. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nature reviews. Clinical oncology*, 12(6), pp.319–34.
- Ghaneh, P., Costello, E. & Neoptolemos, J.P., 2008. Biology and management of pancreatic cancer. *Postgraduate medical journal*, 84(995), pp.478–497.
- Graef, I. a. et al., 2001. Signals transduced by Ca<sup>2+</sup>/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*, 105, pp.863–875.
- Grivennikov, S.I. & Karin, M., 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(1), pp.11–19.
- Guerra, C. et al., 2015. Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell*, 11(3), pp.291–302.
- Hassan, M.M. et al., 2007. Passive smoking and the use of noncigarette tobacco products in association with risk for pancreatic cancer: a case-control study. *Cancer*, 109(12), pp.2547–2556.
- Heinrich, S. et al., 2011. Adjuvant gemcitabine versus NEOadjuvant gemcitabine/oxaliplatin plus adjuvant gemcitabine in resectable pancreatic cancer: a randomized multicenter phase III study (NEOPAC study). *BMC Cancer*, 11, p.346.
- Herz, H.-M., Hu, D. & Shilatifard, A., 2014. Enhancer Malfunction in Cancer. *Molecular cell*, 53(6), pp.859–866.
- Hezel, A.F. et al., 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, 20(10), pp.1218–1249.
- Von Hoff, D.D. et al., 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine*, 369(18), pp.1691–703.

- Hogan, P.G. et al., 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development*, 17 (18), pp.2205–2232.
- Hruban, R.H., Maitra, A., Schulick, R., et al., 2008. Emerging Molecular Biology of Pancreatic Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR*, 2(4 Suppl 2), pp.S10–S15.
- Hruban, R.H., Maitra, A. & Goggins, M., 2008. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International journal of clinical and experimental pathology*, 1(4), pp.306–316.
- Hurwitz, H.I. et al., 2015. Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Ruxolitinib or Placebo in Combination With Capecitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer for Whom Therapy With Gemcitabine Has Failed. *Journal of Clinical Oncology*, 33(34), pp.4039–4047.
- Jacobs, E.J. et al., 2010. Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127(6), pp.1421–1428.
- Jura, N., Archer, H. & Bar-Sagi, D., 2005. Chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma and the black box in-between. *Cell Res*, 15(1), pp.72–77.
- Kadauke, S. & Blobel, G.A., 2009. Chromatin loops in gene regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1789(1), pp.17–25.
- Kanda, M. et al., 2012. Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4), pp.730–733.e9.
- Kaunisto, A. et al., 2015. NFAT1 promotes intratumoral neutrophil infiltration by regulating IL8 expression in breast cancer. *Molecular Oncology*, 9(6), pp.1140–1154.
- Klein, A.P. et al., 2004. Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Research*, pp.2634–2638.
- König, A., Linhart, T., et al., 2010. NFAT-Induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-Dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells. *Gastroenterology*, 138(3), pp.1189–1199.e2.

- König, A., Fernandez-Zapico, M.E. & Ellenrieder, V., 2010. Primers on Molecular Pathways – The NFAT Transcription Pathway in Pancreatic Cancer. *Pancreatology*, 10(4), pp.416–422.
- Konstantinidis, I.T. et al., 2013. Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a “true” R0 resection? *Annals of surgery*, 257(4), pp.731–6.
- Koorstra, J.B.M. et al., 2008. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*, 8(2), pp.110–125.
- Koskela, H.L.M. et al., 2012. Somatic STAT3 Mutations in Large Granular Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine*, 366(20), pp.1905–1913.
- Krebsdaten 2015, Krebs - Bauchspeicheldrüsenkrebs. Available at: [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html) [Accessed August 14, 2015].
- Krivega, I. & Dean, A., 2012. Enhancer and promoter interactions—long distance calls. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(2), pp.79–85.
- Lee, J.-Y. & Hennighausen, L., 2005. The transcription factor Stat3 is dispensable for pancreatic  $\beta$ -cell development and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(3), pp.764–768.
- Lesina, M. et al., 2014. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas. *Seminars in Immunology*, 26(1), pp.80–87.
- Lesina, M. et al., 2011. Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, 19(4), pp.456–469.
- Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8[thinsp]Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251–260.
- Luo, C. et al., 1996. Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), pp.8907–8912.
- Macian, F., 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5(6), pp.472–484.
- Macián, F., López-Rodríguez, C. & Rao, a, 2001. Partners in transcription: NFAT and

- AP-1. *Oncogene*, 20(19), pp.2476–2489.
- Malvezzi, P. & Rostaing, L., 2015. The safety of calcineurin inhibitors for kidney-transplant patients. *Expert Opinion on Drug Safety*, 14(10), pp.1531–1546.
- Mancini, M. & Toker, A., 2009. NFAT Proteins: Emerging Roles in Cancer Progression. *Nature reviews. Cancer*, 9(11), pp.810–820.
- Marsman, J. & Horsfield, J.A., 2012. Long distance relationships: Enhancer–promoter communication and dynamic gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(11–12), pp.1217–1227.
- Matsuda, Y. et al., 2015. Gradual Telomere Shortening and Increasing Chromosomal Instability among PanIN Grades and Normal Ductal Epithelia with and without Cancer in the Pancreas A. J. Lustig, ed. *PLoS ONE*, 10(2), p.e0117575.
- McLean, C.Y. et al., 2010. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotech*, 28(5), pp.495–501.
- Medyouf, H. et al., 2007. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, 13(6), pp.736–741.
- Metzelder, S.K. et al., 2015. NFATc1 as a therapeutic target in FLT3-ITD-positive AML. *Leukemia*, 29(7), pp.1470–1477.
- Migone, T.S. et al., 1995. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5220), pp.79–81.
- Molnar, A.O. et al., 2015. Generic immunosuppression in solid organ transplantation: systematic review and meta-analysis. *BMJ : British Medical Journal*, 350, p.h3163.
- Neesse, A. et al., 2014. Emerging concepts in pancreatic cancer medicine: targeting the tumor stroma. *OncoTargets and therapy*, 7, pp.33–43.
- Nolis, I.K. et al., 2009. Transcription factors mediate long-range enhancer–promoter interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), pp.20222–20227.
- O’Shea, J.J., Holland, S.M. & Staudt, L.M., 2013. JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(2), pp.161–170.
- Ong, C.-T. & Corces, V.G., 2012. Enhancers: emerging roles in cell fate specification. *EMBO Reports*, 13(5), pp.423–430.

- Özdemir, B.C. et al., 2014. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Diminished Survival. *Cancer cell*, 25(6), pp.719–734.
- Porta, M. et al., 2005. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 7(5), pp.189–97.
- Qiu, W. & Su, G.H., 2013. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer metastasis reviews*, 32(0), pp.10.1007/s10555–012–9408–2.
- Rao, A., Luo, C. & Hogan, P.G., 1997. Transcription Factors of the NFAT family : Regulation and Function. *Annual Review of Immunology*, 15(1), pp.707–747.
- Remo, A. et al., 2015. Systems biology analysis reveals NFAT5 as a novel biomarker and master regulator of inflammatory breast cancer. *Journal of Translational Medicine*, 13, p.138.
- Rhim, A.D. et al., 2014. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 25(6), pp.735–747.
- Ryan, D.P., Hong, T.S. & Bardeesy, N., 2014. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 371, pp.1039–1049.
- Scalea, J.R. et al., 2015. Tacrolimus for the prevention and treatment of rejection of solid organ transplants. *Expert Review of Clinical Immunology*, pp.1–10.
- Scholz, A. et al., 2003. Activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 125(3), pp.891–905.
- Shaw, J.P. et al., 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241(4862), pp.202–205.
- Shigekawa, M. et al., 2012. Pancreatic STAT3 protects mice against caerulein-induced pancreatitis via PAP1 induction. *American Journal of Pathology*, 181(6), pp.2105–2113.
- Shou, J. et al., 2015. Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. *Cancer Letters*, 361(2), pp.174–184.



- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A., 2015. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1), pp.5–29.
- Singh, H., Longo, D.L. & Chabner, B. a., 2015. Improving Prospects for Targeting RAS. *Journal of Clinical Oncology*.
- Singh, S.K. et al., 2015. Antithetical NFATc1–Sox2 and p53–miR200 signaling networks govern pancreatic cancer cell plasticity. *The EMBO Journal*, 34(4), pp.517–530.
- Singh, S.K. et al., 2011. Disruption of a Nuclear NFATc2 Protein Stabilization Loop Confers Breast and Pancreatic Cancer Growth Suppression by Zoledronic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(33), pp.28761–28771.
- Siveen, K.S. et al., 2014. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(2), pp.136–154.
- Song, L. & Crawford, G.E., 2010. DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harbor protocols*, 2010(2), p.pdb.prot5384–pdb.prot5384.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), pp.41–45.
- Toyonaga, T. et al., 2003. Blockade of constitutively activated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway inhibits growth of human pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 201(1), pp.107–116.
- Tripathi, M.K. et al., 2014. Nuclear Factor of Activated T-cell Activity Is Associated with Metastatic Capacity in Colon Cancer. *Cancer Research*, 74(23), pp.6947–6957.
- Waddell, N. et al., 2015. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518(7540), pp.495–501.
- Wake, M.S. & Watson, C.J., 2015. STAT3 the oncogene – still eluding therapy? *FEBS Journal*, 282(14), pp.2600–2611.
- Wang, H. et al., 2011. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: A novel therapeutic target. *International Journal of Biological Sciences*, 7(5), pp.536–550.
- Wu, A. et al., 2010. NFAT and AP1 are Essential for the Expression of a Glioblastoma

- Multiforme Related IL-13Ra2 Transcript. *Cellular Oncology : the Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*, 32(5-6), pp.313–329.
- Wu, H. et al., 2015. NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends in Cell Biology*, 17(6), pp.251–260.
- Xie, K., Wei, D. & Huang, S., 2006. Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(3), pp.147–156.
- Yeo, T.P., 2015. Demographics, Epidemiology, and Inheritance of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Seminars in Oncology*, 42(1), pp.8–18.
- Yoon, K.H., 2010. Efficacy and Cytokine Modulating Effects of Tacrolimus in Systemic Lupus Erythematosus: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, p.686480.
- Yu, C.L. et al., 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5220), pp.81–83.
- Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R., 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, 9(11), pp.798–809.
- Zhang, J. et al., 2015. Herpesviral G Protein-Coupled Receptors Activate NFAT to Induce Tumor Formation via Inhibiting the SERCA Calcium ATPase B. Chandran, ed. *PLoS Pathogens*, 11(3), p.e1004768.

## 8 Anhang

### 8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle1 - Anzahl der verschiedenen PanIN-Läsionen nach 8 Wochen im Vergleich.....	7
Tabelle 2 - Laborgeräte.....	20
Tabelle 3 - Materialien .....	21
Tabelle 4 - Chemikalien .....	24
Tabelle 5 - Standards, Kultivierungsmedien und Zusätze .....	25
Tabelle 6 - Kits.....	25
Tabelle 7 - Vektoren und Konstrukte.....	27
Tabelle 8 - Enzyme .....	27
Tabelle 9 - Oligonukleotide .....	28
Tabelle 10 - Verwendete Primer für qRT-PCR .....	50
Tabelle 11 - Verwendete Zelllinien .....	51
Tabelle 12 - RT-PCR Primer für DNase 1 Hypersensitivitäts-Assay .....	54
Tabelle 13 - Primärantikörper für Western Blot Analyse .....	57
Tabelle 14 - Sekundärantikörper für Western Blot Analyse .....	57
Tabelle 15 - Antikörper ChIP.....	62

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der genetischen und histologischen Progression im Pankreaskarzinom. ....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der NFAT-Signalkaskade.. ....	6
Abbildung 3: Überlebenskurve verschiedener Mausgenotypen nach Kaplan-Meier. ....	7
Abbildung 4: JAK-STAT3-Signalweg.....	10
Abbildung 5: STAT3 ist in transgenen p48-Cre; KRAS <sup>G12D</sup> ; NFATc1-Mäusen überexprimiert. ....	12
Abbildung 6: Statistische Illustration der Expression von nukleärem NFATc1 sowie der nukleären Expression von pSTAT3 bei NFATc1-positiven Mäusen durch Tissue Microarray.....	12
Abbildung 7: ChIP-seq-Analyse ergibt eine STAT3-abhängige DNA-Bindung von NFATc1 in 1219 von 1798 Fällen (67.8%). ....	13
Abbildung 8: NFATc1 bindet vermehrt distal des Startorts der Transkription (TSS). ...	14
Abbildung 9: Schematische Darstellung inaktiver Enhancer und Promotor.. ....	16
Abbildung 10: Schematische Darstellung aktiver Enhancer und Promotor. ....	16
Abbildung 11: vereinfachtes Kreuzungsschema der verwendeten Mauszüchtlinien. ...	38
Abbildung 12: Beispielhafte Präparationsvorlage für Arbeiten mit Zuchtmäusen.....	39
Abbildung 13: Eröffneter Maussitus und entnommene Organe. ....	40
Abbildung 14: Polaroidbild einer Agarosegelelektrophorese nach STAT3-PCR. ....	47

---

Abbildung 15: NFATc1 bindet an Enhancerregionen ausgewählter Zielgene. ....	66
Abbildung 16: Die Bindungsstellen von NFATc1 weisen Modifikationen auf, die typisch für Enhancerregionen sind. ....	67
Abbildung 17: NFATc1 bindet primär am Enhancer von RCAN1.....	68
Abbildung 18: NFATc1 – Knockdown führt zu weniger offenen Chromatinstellen, die von der DNase I gespalten werden können.....	69
Abbildung 19: Ausgewählte Enhancerregionen werden durch NFATc1 geöffnet und rekrutieren p300.....	70
Abbildung 20: Ausgewählte Enhancerregionen werden durch NFATc1 geöffnet und rekrutieren p300.....	70
Abbildung 21: STAT3 bindet primär an Promotoren von ausgewählten Zielgenen. ....	71
Abbildung 22: STAT3 reguliert die NFATc1-Bindung an ausgewählten Enhancerregionen und reguliert die Genexpression ausgewählter Zielgene. ....	72
Abbildung 23: STAT3 reguliert im Zusammenspiel mit NFATc1 die Transkriptionsaktivität des RCAN1-Gens.....	74
Abbildung 24: Interleukin-6 reguliert die Bindung von NFATc1 an Enhancersequenzen und STAT3 an Promotorsequenzen.. ....	76
Abbildung 25: IL-6 erhöht die RCAN1 mRNA-Expression nur in NKC-Zellen mit NFATc1. ....	77
Abbildung 26: Überlebenskurve KNS-Homo/KNS-Hetero/NKC nach Kaplan-Meier. ....	79
Abbildung 27: Homozygote KNS-Mäuse zeigen deutlich größere und solidere Tumoren als NKC-Mäuse nach 4 und 12 Wochen.. ....	80

---

Abbildung 28: HE-Färbungen der Pankreata von NKC- und KNS-Homo-Mäusen nach 4 Wochen.....	81
Abbildung 29: HE-Färbungen der Pankreata von NKC- und KNS-Homo-Mäusen nach 8 Wochen.....	82
Abbildung 30: HE-Färbungen der Pankreata von NKC- und KNS-Homo-Mäusen nach 12 Wochen.....	83
Abbildung 31: Kollagenfärbung (Kollagen 1&3) von 8-Wochen alten NKC-, KNS Hetero- und KNS Homo-Mäusen. ....	84
Abbildung 32: Schematische und vereinfachte Darstellung des propagierten Enhancer-Promotor Loopings durch NFATc1 und STAT3 in NKC-Zellen.....	88
Abbildung 33: Schematische Darstellung der verschiedenen untersuchten transgenen Mäuse im Kontext einer KRAS <sup>G12D</sup> -Aktivierung. ....	90
Abbildung 34: Mögliches Schema zur molekularen Stratifizierung von Pankreastumoren zur weiteren Therapieplanung in Abhängigkeit des NFATc1-Status. ....	95

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ADM	azinär-duktale Metaplasie
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	bovine serum albumine
bp	Basenpaare
c.a.	constitutive active
cDNA	komplementäre DNA
ChiP	Chromatin ImmunoPrecipitation
Ck19	Cytokeratin 19
CT	Computertomographie
DAB	Diaminbenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DesoxyribonukleinsäureRN
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FCS	Fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin
Gp130	Glykoprotein 130
HA	human influenza hemagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin 6
IPMN	Intraductal pancreatic mucinous neoplasia

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Jak	Janus Kinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LSL-KRAS	latent lox-STOP-lox KRAS
mA	Mikroampere
Mcl1	myeloid cell leukemia 1
Mdm2	mouse double minute 2 homolog
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mmp13	Matrix-Metalloprotease 13
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NFATc1	Nuclear factor of activated t-cells
nm	Nanometer
NP	nonyl phenoxypolyethoxylethanol
PanIn	pancreatic intraepithelial neoplasia
PBND	PCR Buffer with nonionic detergents
PBS	phosphatgebufferte Salzsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
pSTAT3	Phosphoryliertes STAT3
RCAN	Regulator of calcineurin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA Polymerase II
rpm	rounds per minute
SCID	Severe combined immunodeficiency syndrome
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	Tris buffered saline



---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
TBST	Tris buffered saline + tween 20
T-LGL-Leukämie	Large Granular Lymphocyte - Leukämie
TMA	Tissue microarray
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	Transkriptionsstartpunkt
TSS	Transcription start side
TYK	Tyrosin Kinase
UV	Ultraviolett
Y705	Tyrosin 705
µl	Mikroliter

## 8.4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz	Kill	Preisig-Müller
Baarlink	Kinscherf	Renz
Bartsch	Kircher	Richter
Bauer	Klose	Rierra-Knorrenschild
Baum	Köhler	Röhm
Baumann	Koolman	Rost
Becker	Kruse	Ruchholtz
Bette	Kühnert	Schäfer
Bien	Lill	Schieffer
Brehm	Löffler	Schneider
Burchert	Lohoff	Seifart
Czubayko	Lüers	Sekundo
Daut	Mahnken	Sevinc
Del Rey	Maier	Shir
Dettmeyer	Mayer	Stiewe
Dodel	Michl	Tackenberg
Ellenrieder	Meissner	Teymoortash
Geks	Moll	Vogelmeier
Görg	Moosdorf	Vogt
Gress	Müller	Wagner
Fendrich	Mueller	Waldegger
Fritz	Mutters	Weihe
Fuchs-Winkelmann	Neubauer	Werner
Hegele	Nimsky	Westermann
Hertl	Oertel	Wrocklage
Hofmann	Olbert	Wulf
Homberg	Oliver	Zemlin
Hoyer	Opitz	
Koczulla	Pagenstecher	
Kann	Plant	

Meine akademischen Lehrer während des ERASMUS in Tampere, Finnland, waren die Damen und Herren:

Hakkarainen	Lehto	Moilanen
Hämäläinen	Manninen	Nikkari
Kaukinen	Mäenpää	Paavonen
Kiekara	Mäki	

Meine akademischen Lehrer im Tertiä Innere Medizin am Universitätsklinikum Göttingen waren die Damen und Herren:

Cameron	König	Raupach
Ellenrieder	Kunsch	Schroeter
Hasenfuß	Neesse	Schwörer
Hünlich	Raddatz	

Meine akademischen Lehrer im Tertiä Chirurgie am Klinikum Schwabing in München waren die Damen und Herren:

Gass	Höcherl	Witt
Hierl	Waldner	Wolf

Meine akademischen Lehrer im Wahltertiä Pädiatrie am Universitätsklinikum Göttingen waren die Damen und Herren:

Gärtner	Kühnle	Wilichowski
Kramm	Sigler	

## 9 Danksagung

Abschließend möchte ich die Gelegenheit nutzen, an dieser Stelle noch einigen Menschen zu danken:

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. V. Ellenrieder, für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe eine Doktorarbeit absolvieren zu dürfen. Durch seine stetige Förderung, die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, meine Daten auf einem Kongress einer breiteren Öffentlichkeit zu präsentieren, blicke ich auf drei lehrreiche und spannende Jahre im Labor zurück. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. T. Gress für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu promovieren.

Weiterhin möchte ich besonders Dr. Sandra Baumgart, die meine Arbeit im Labor betreut und mich maßgeblich in alle Methoden und Themen eingearbeitet hat, für ihre gute und umfassende Betreuung danken. Ebenso möchte ich mich bei Bettina Geisel und Kristina Reutlinger bedanken für ihre Unterstützung bei allen großen und kleinen Problemen des Laboralltags sowie für die Gestaltung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ein weiterer Dank gilt auch Dr. Nai-ming Chen, der mir von den Grundlagen von Photoshop, über die Aufarbeitung von Mauspankreatas bis hin zu histologischen Färbungen viele Details geduldig erläuterte. Ebenso möchte ich ihm für die fortlaufende Bereitschaft danken, an langen Labortagen Kaffeepausen einzulegen, die häufig nicht nur erholsam, sondern auch lehrreich waren. An dieser Stelle möchte ich ebenfalls meinen Mitdoktoranden, besonders Fabian Becker, Johanna Reinecke, Lisanne Regul und Moritz Dyck, für die Gestaltung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre, auch an den Wochenenden, sowie ein immer vorhandenes offenes Ohr bei allen Problemen, sei es wissenschaftlicher oder privater Natur, danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Elisabeth Hessmann, die mich nicht nur während der Zeit im Labor, sondern auch besonders in der Phase der Verfassung der Dissertation begleitet hat. Ihr möchte ich für die vielen Verbesserungsvorschläge sowie die viele Zeit, die sie in das Korrekturlesen dieser Arbeit gesteckt hat, besonders danken.

Ein erheblicher Dank gilt meinen Eltern Karin und Jürgen Brunner für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums sowie der Zeit meiner Doktorarbeit und meiner

Schwester Sina Brunner für ihre künstlerische Begabung in der graphischen Gestaltung der Doktorarbeit.

Zuletzt möchte ich besonders meiner Freundin Noemi Rittmeyer danken, ohne deren Motivation, Rückhalt und Verständnis das Verfassen dieser Arbeit deutlich länger gedauert hätte.